Schlussbericht der TU Dresden

Projekt

Biologische Ganzzell-Sensor-Aktor-Systeme für die Bioverfahrenstechnik und Umwelttechnologie (Bio-SAT)

WK · POTENZIAL
UNTERNEHMEN REGION
Die BMBF-Innovationsinitiative Neue Länder

Schlussbericht

Vorhabensbezeichnung:
Biologische Ganzzell-Sensor-Aktor-Systeme für die Bioverfahrenstechnik und Umwelttechnologie (Bio-SAT)
Laufzeit des Vorhabens: 01.02.2009 bis 31.01.2012
Förderkennzeichen: 03WKP08

Projektpartner:
Technische Universität Dresden

Institut für Genetik (IfG), TU Dresden
Zellescher Weg 20b
01069 Dresden

Institut für Werkstoffwissenschaft (IfWW), TU Dresden
Hallwachsstr. 3
01069 Dresden

Professur für Organische Chemie der Polymere (OCP), TU Dresden
Hohe Straße 6
01069 Dresden

Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik (ILB), TU Dresden
Bergstraße 120
01069 Dresden

I 1. Aufgabenstellung:

Mit diesem Vorhaben sollten neuartige biohybride Materialien auf der Basis von immobilisierten Mikroorganismen entwickelt werden, deren Werkstoffverhalten über das einer reinen sensorischen Applikation hinausgeht. Durch Nutzung biologischer Stoffwechsel- und Kommunikationswege sollten verschiedene Module für Sensor-Schalter-Aktor-Systeme etabliert werden. Anwendungsgebiete für solche neuartigen Sensor-Aktor-Systeme finden sich in den Bereichen Bioverfahrenstechnik, Lebensmitteltechnologie, Wasser- und Umwelttechnologie, aber auch in der pharmazeutischen Industrie und Medizintechnik. Aus diesen Feldern sollten Sensor-Aktor- Module an vier ausgewählten Demonstratoren exemplarisch zusammengeführt werden.

Dem Institut für Genetik (IfG) oblagen die molekularbiologischen Arbeiten zur Generierung rekombinanter Hefezellen, die als „Sensor“, “Schalter“ oder „Aktor“ fungieren können. Die erzeugten Hefen wurden den Projektpartnern zur Verfügung gestellt.

Ziel des Teilprojektes des Instituts für Werkstoffwissenschaft (IfWW) war es, bioresponsive Materialien für den Aufbau der extrazellulären Matrix bereitzustellen. Unter den verschiedenen Lösungsstrategien sollte hier insbesondere die Möglichkeit der enzymatischen und pH-abhängigen Permeabilisierung der Hüllenstrukturen verfolgt werden.

Das Institut für Organische Chemie der Polymere (OCP) sollte sich mit der Immobilisierung von Enzymen in bzw. an Hydrogelmaterialien/-oberflächen beschäftigen, die sowohl reversibel als auch permanente Kopplungen von Enzymen an den Materialoberflächen aufweisen sollten.

Die Arbeiten des Institutes für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik (ILB) hatten das Ziel, am Beispiel des Hydrophobins Hfb1 aus *Trichoderma reesei* unter Zuhilfenahme von Bilanzierung und Modellierung den Herstellungsprozess eines oberflächenaktiven Proteins zu optimieren.

I 2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Arbeitsgruppe von Prof. G. Rödel (IfG) hat langjärige Erfahrungen in der Klonierung von DNA, der gerichteten Mutagenese und der rekombinanten Erzeugung von Proteinen in Hefen und Bakterien sowie der Funktionalisierung ganzer Zellen - insbesondere von Hefen – im Rahmen der Biosensorik und des „metabolic engineering“. Die Etablierung von Hefe-Pheromon basierten Kommunikations- und Verstärkersystemen sowie die Entwicklung von Hefen als Sensoren und Aktoren wird seit mehreren Jahren erfolgreich betrieben. Zu dem Themenfeld liegen entsprechende Publikationen sowie Patentanmeldungen vor. Der Arbeitsgruppe stehen am IfG modern ausgestattete Labore der Sicherheitsstufe S1 mit der notwendigen apparativen Ausstattung zur Verfügung. Seit Jahren pflegt das Institut eine

ausgesprochen fruchtbare Zusammenarbeit mit universitären Partnern sowie mehreren KMUs.

Im IfWW der TU Dresden werden an *der Professur Materialwissenschaft und Nanotechnik* seit 1994 unter der Leitung von Prof. W. Pompe und seit fünf Jahren unter Prof. G. Cuniberti schwerpunktmäßig Untersuchungen an Biomaterialien für umwelttechnologische, biosensorische und medizinische Anwendungen durchgeführt. So bestehen am Lehrstuhl langjährige Erfahrungen auf dem Gebiet der Strukturbildung unter Nutzung von biomolekularen Templaten, der Einbettung von (lebenden) Mikroorganismen in biokompatible Matrices, der Entwicklung Schadstoff-bindender Biokompositmaterialien und neuerdings des Aufbaus von Biosensoren auf der Basis metallischer und halbleitender Nanodrähte sowie des Einsatzes pyroelektrischer Materialien zur Wasserdesinfektion. Die Arbeitsgruppe stützt sich dabei u. a. auf eine bewährte, enge Zusammenarbeit mit verschiedenen Arbeitsgruppen der TU Dresden (Professor Rödel (IfG), Professor Gerlach (IfE), Professor Bley (IfLB)), Prof. Böttcher (GMBU), der Forschergruppe „BioNano“ des Helmholtz-Zentrums Dresden- Rossendorf (HZDR), dem Leibniz-Institut für Polymerforschung (IPF) sowie verschiedenen Fraunhofer-Instituten und Einrichtungen der Max-Planck-Gesellschaft im Raum Dresden. Im Rahmen mehrerer anwendungsorientierter, durch das BMBF geförderter, Forschungsvorhaben konnte in den letzten Jahren ein stabiles Netzwerk mit einer Reihe innovativer KMUs innerhalb Sachsens und den angrenzenden Bundesländern aufgebaut werden. Das IfWW verfügt über eine breite Palette analytischer und bildgebender Methoden, die für eine umfassende Charakterisierung von Biomaterialien hervorragend geeignet sind.

Das OCP hat langjährige Erfahrungen auf dem Gebiet der Hydrogele und Schichtpräparation von Hydrogelschichten. Darüber hinaus wurden Strategien zur Biokonjugation an Hydrogelschichten etabliert, um im Rahmen des Projektziels letztendlich funktionsfähige Enzyme anzukoppeln.

Das ILBT an der TU Dresden unter Leitung von Herrn Prof. Bley arbeitet an der Schnittstelle zwischen Stammentwicklung und industrieller Umsetzung. Dem Institut steht hierfür eine Vielzahl von Kultivierungssystemen zur Verfügung (RAMOS-Anlage, Multifors Bioreaktoren). Zur Prozessanalytik stehen vielfätige Methoden wie z.B. die Durchflußzytometrie, HPLC, GC und Western Blot Analysen zur Verfügung. Die Konzentrierung, Reinigung und Aktivität der Proteine wurde in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Radiochemie am HZDR unter Einsatz von Atomkraftmikroskopie und Verwendung einer Filmwaage untersucht.

I 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Für jeden Teilprojektpartner stellten sich innerhalb der Komponenten Sensor, Schalter und Aktor spezifische Aufgaben, die schließlich in der Umsetzung auf die spezifischen Anforderungen der einzelnen Demonstratoren angepasst und zusammengeführt wurden (Abb. 1). Durch regelmäßige Arbeitstreffen auf kleiner Ebene wurde insbesondere zwischen dem IfG, der GMBU, dem IPF und dem IfWW ein zügiger Erfahrungsaustausch gewährleistet und eine zeitnahe Umsetzung der für das Projektziel relevanten Erkenntnisse erreicht. Die zeitliche Planung und der Ablauf ergeben sich aus dem im Antrag dargestellten Balkenplan sowie den darin angegebenen und im Projekt fristgemäß erreichten Meilensteinen.

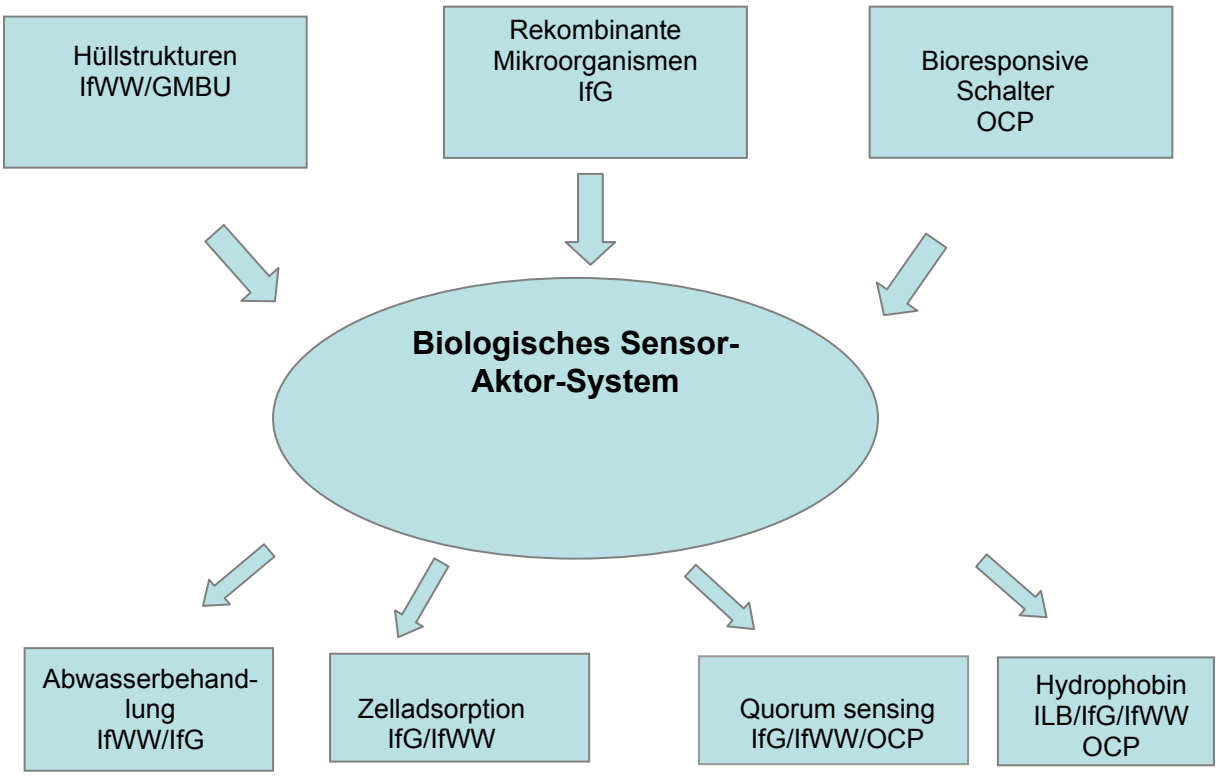


Abb. 1: Zusammenführung der Arbeitsprogramme der Teilprojekte

I 4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde: Wissenschaftliche Ausgangsposition

Die biologische Basis für die Entwicklung der Sensor-Aktor-Module bildete vor Allem die Hefe *Saccharomyces* (*S.) cerevisiae.* Sie spielt in der Molekularbiologie und in der Bioverfahrenstechnik auf Grund ihrer Stoffwechselaktivitäten und Robustheit eine überragende Rolle, darüber hinaus bietet sie weitgehende und vielfältige Möglichkeiten zur maßgeschneiderten Veränderung mittels rekombinanter DNA-Technologien. Ein Hefe-basierter biotechnologischer Prozess zur Herstellung von oberflächenaktiven Hydrophobinen

war noch nicht etabliert, ebenso existierte zum Zeitpunkt des Projektstarts kein etabliertes Verfahren zur permanenten/reversiblen Anbindung von Enzymen in Gegenwart von anorganischen/organischen umhüllten Zellen. Daher mussten Strategien der Einbettung entwickelt werden, welche die Vitalität der umhüllten Zellen nicht oder nur geringfügig beeinträchtigen.

I 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Neben der intensiven Zusammenarbeit mit den Projektpartnern sowie der entsprechenden Bereitstellung der entwickelten Hefen/Materialien für die Partner ergab sich seitens des IfG eine sehr erfolgreiche Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Zellbiologie und Genetik (MPI-CBG) in Dresden, mit dem im Unterauftrag die umfangreichen Transkriptomanalysen durchgeführt wurden. Im Rahmen der Untersuchungen zur „Zelladsorption“ war es notwendig, den Kupfergehalt der rekombinanten Hefen zu untersuchen. In diesem Zusammenhang ergab sich eine sehr effektive Zusammenarbeit mit Frau Dr. Auffermann vom Max-Planck-Institut für Chemische Physik fester Stoffe in Dresden, welche die entsprechenden ICP-MS Analysen durchführte, die zu einer gemeinsamen Publikation führte (Manuskript eingereicht).

Zur Erfüllung der Aufgaben im Rahmen des IfWW wurde die GMBU e.V. unterbeauftragt. Zu den Aufgaben der GMBU e. V. gehörte die enzymatische Spaltung von Hüllstrukturen auf Polyester- und Cellulosebasis und das Screening nach geeigneten Hüllstrukturen, die durch pH-Wertabsenkung permeabilisiert werden können.

Ein enger fachlicher Austausch erfolgte weiterhin mit der Firma GeSim beim Thema µ-Kontakt Printing.

Im Rahmen eines studentischen Gastaufenthaltes des Erasmus-Programmes bestand eine Kooperation mit der Universität von Minho, Portugal (Dep. Industrial Electronics).

Seitens des ILBT wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Radiochemie am Helmholz Zentrum Dresden Rossendorf AFM- und Oberflächendruck-Messungen durchgeführt.

ZE:	Förderkennzeichen:
TU Dresden, Institut für Genetik, Professur für Allgemeine Genetik Prof. Dr. G. Rödel	03WKP08

II 1. Eingehende Darstellung der Ergebnisse:

Das IfG fokussierte seine Arbeiten planungsgemäß auf die Entwicklung von beispielhaften Lösungsansätzen in den Modulen „Sensor“, „Schalter“ sowie „Aktor“ und wirkte an der Entwicklung der Demonstratoren durch Bereitstellung benötigter Komponenten mit.

A1: Modul „Sensor“

In diesem Sensor sollten spezifisch auf Analyte ansprechende Promotoren identifiziert und für die Entwicklung von rekombinante Sensorhefen genutzt werden.

A1-1: Sensoren für chemische Schad- und Arzneistoffe

A1-1-1: Transkriptom und Promotoranalysen

Ziel der Transkriptom- und Promotoranalysen war die Identifizierung spezifisch ansprechender Promotoren. Die Hybridisierung der Microarrays erfolgte am Max Planck Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik (MPI-CBG) im Unterauftrag. Für *Saccharomyces cerevisiae* wurde der “Agilent Yeast V2 Gene Expression Microarray” (DesignID: 016322) mit 6256 Sonden verwendet. Für *Schizosaccharomyces pombe* wurde in Kooperation mit dem MPI-CBG das für die Herstellung notwendige Chip-Design erarbeitet.

Zunächst wurden Transkriptomanalysen von *S. cerevisiae* in Anwesenheit von Antibiotika aus der Gruppe der ß-Laktame (Ampicillin, Penicillin G) und der Tetracycline (Doxycyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin) durchgeführt. Die eingesetzte Konzentration betrug jeweils 10 µg/ml.

Wie in Abb. 1 dargestellt, war keine starke Veränderung des Transkriptionsmusters als Antwort auf die verschiedenen Antibiotikagaben festzustellen (diese wären an ihrer Lage außerhalb der grünen *cut-off* Linien im Scatterblot zu erkennen).

Tab. 1 fasst der Anzahl an signifikant regulierten Genen zusammen. Sowohl nach 15- als auch 60-minütiger Einwirkung der Antibiotika war die Anzahl der regulierten Gene gering. Bei Tetracyclingabe war nach 15 Minuten ebenfalls nur eine sehr geringe Zahl an Genen reguliert, wohingegen nach 60 Minuten deutlich mehr Gene in Abhängigkeit von dem verwendeten Tetracyclin reguliert wurden. Die höchste Anzahl wurde bei Zugabe von Doxycyclin ermittelt.

Für die Verwendung des entsprechenden Promotors in einem Sensorsystem ist u.a. das Ausmaß der erfolgten Regulation entscheidend. Tab. 2 zeigt die maximale Höhe der Genregulation in Antwort auf die Antibotikazugabe. Diese war in allen untersuchten Proben sehr gering. Ein einziges Gen wies eine stärkere (17.5-fache) Herabregulation nach 60

Minuten in Antwort auf Doxycyclin auf. Dieser Wert konnte jedoch mittels Real-Time RT-PCR nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

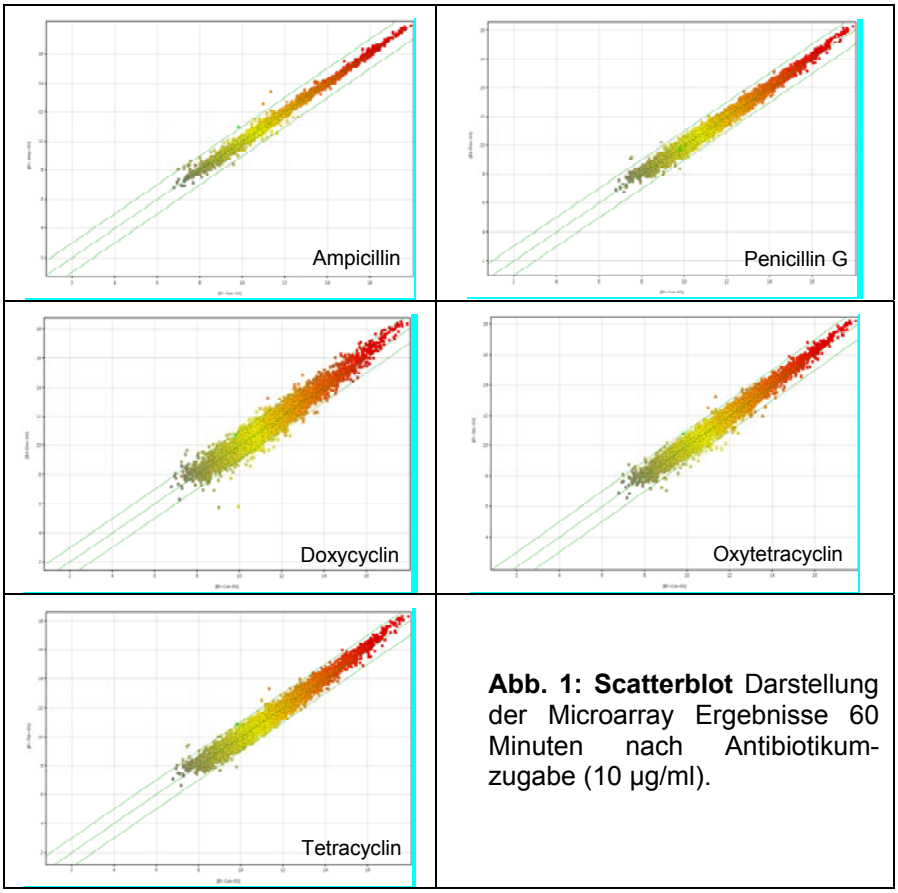


Abb. 1: Scatterblot Darstellung der Microarray Ergebnisse 60 Minuten nach Antibiotikum-zugabe (10 µg/ml).

Tab. 1 Anzahl an regulierten Genen von *S. cerevisiae* in Abhängigkeit des zugesetzten Antibiotikums. Inkubationsdauer 15 bzw. 60 Minuten, verwendete Konzentration 10 µg/ml.

		Anzahl an regulierten Genen					
		15 min			60 min		
Antibiotikagruppe	**Antibiotikum**	**Hoch**	**Herunter**	**Gesamt**	**Hoch**	**Herunter**	**Gesamt**
ß-Laktame	Ampicillin	0	12	12	6	2	8
ß-Laktame	Penicillin G				3	2	5
Tetracycline	Doxycyclin				103	57	160
Tetracycline	Oxytetracyclin	1	3	4	16	32	48
Tetracycline	Tetracyclin				14	5	19

Tab. 2 Maximaler Faktor der Genregulation (x-fach) in Abhängigkeit des zugesetzten Antibiotikums. Inkubationsdauer 15 bzw. 60 Minuten, verwendete Konzentration 10 µg/ml.

Maximale Höhe der Genregulation (x-fach)					
		15 min		60 min	
Antibiotikagruppe	**Antibiotikum**	**Hoch**	**Herunter**	**Hoch**	**Herunter**
ß-Laktame	Ampicillin	-	5,3	4,3	2,2
ß-Laktame	Penicillin G			3,2	2,6
Tetracycline	Oxytetracyclin	2,1	3,1	3,8	3,9
Tetracycline	Doxycyclin			4,4	17,5
Tetracycline	Tetracyclin			4,0	3,6

Die geringe Höhe der Expressionsänderungen ist suboptimal für die Generierung von Sensorhefen. Daher wurden im Folgenden Antibiotika mit einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt und die jeweilige Inkubationszeit verlängert. Zusätzlich wurde der Einfluss von Kulturbedingungen (Nutzung von exponentiell wachsenden oder stationären Kulturen) untersucht.

Tab. 3 fasst die Anzahl an regulierten Genen zusammen. Die meisten wurden nach 60-minütiger Einwirkung der Antibiotika festgestellt, wobei bei Zugabe von Doxycyclin die höchsten Werte ermittelt wurden. Nach 15 und 180 Minuten erwies sich nur eine sehr geringe Anzahl an Genen als reguliert. Die geringste Auswirkung auf das Transkriptom ergab sich für eine stationäre Hefekultur nach 15 Minuten Inkubation in Anwesenheit der Antibiotika.

Tab. 3 Anzahl an regulierten Genen von *S. cerevisiae* in Abhängigkeit des zugesetzten Antibiotikums. Inkubationsdauer 15, 60 und 180 Minuten, verwendete Konzentration 100 µg/ml, Kulturbedingungen exponentiell (ex) und stationär (st).

Anzahl an regulierten Genen				
Antibiotikum	**15 min ex**	**15 min st**	**60 min ex**	**180 min ex**
Ampicillin	2	2	28	1
Doxycyclin	12	2	63	3
Tetracyclin	6	2	31	3

Tab. 4 Maximale Höhe der Genregulation (x-fach) in Abhängigkeit des zugesetzten Antibiotikums. Inkubationsdauer 15, 60 und 180 Minuten, verwendete Konzentration 100 µg/ml, Kulturbedingungen exponentiell (ex) und stationär (st).

Maximale Höhe der Genregulation (x-fach)								
	15 min (ex)		**15 min (st)**		**60 min (ex)**		**180 min (ex)**	
Antibiotikum	**Hoch**	**Herunter**	**Hoch**	**Herunter**	**Hoch**	**Herunter**	**Hoch**	**Herunter**
Ampicillin	2,3	3,0	2,4	2,3	4,0	9,1	-	2,3
Doxycyclin	21.7	2,9	2,3	-	3,7	7,7	2,4	2,6
Tetracyclin	2,2	3,1	2,2	-	5,0	6,4	3,2	2,0

Tabelle 4 zeigt die maximale Höhe der Genregulation in Antwort auf die Antibotikazugabe. Ein einziges Gen wies eine nennenswert starke Hochregulation (21.7-fach) nach 15 Minuten Inkubation mit Doxycyclin auf. Auch dieser Wert konnte jedoch in unabhängigen Versuchen mittels Real-Time (RT)-PCR nicht bestätigt werden. Ansonsten ist die maximale Höhe der Genregulation in allen Proben gering, höhere Werte wurden nur für herunterregulierte Gene nach 60 minütiger Antibiotikazugabe festgestellt. Hierbei handelte es sich um das 6.4 bis 9.1-fach herunterregulierte Gen *YMR279C*, das für ein Protein mit Homologien zu

Schadstofftransportern kodiert. Diese Genregulation ist jedoch nur transient, da sie nach 180 Minuten nicht mehr feststellbar ist.

Ausgehend von den obigen Daten wurden Reporterkonstrukte unter Verwendung der 5'-URS (5'-upstream regulatory sequence) der Gene *YMR279C* und *YDL133C-A* generiert. Letzteres kodiert für ein ribosomales Protein. In den folgenden Bioassays, bei denen entsprechende Hefen mit den Reporterkonstrukten transformiert wurden und die Fluoreszenz in einem Plattenreader analysiert wurde, konnte für beide Sensorkonstrukte keine signifikante (größer 2-fach bzw. kleiner 0,5-fach) Antwort auf Antibiotikazugabe festgestellt werden. Eine transiente Herunterregulation ist aufgrund der Stabilität des Reporterproteins äußert schwer bzw. nicht detektierbar. Exemplarisch sind in Abb. 2 die Ergebnisse für das Konstrukt 5'-URS*(YDL133C-A)::TGFP* gezeigt.

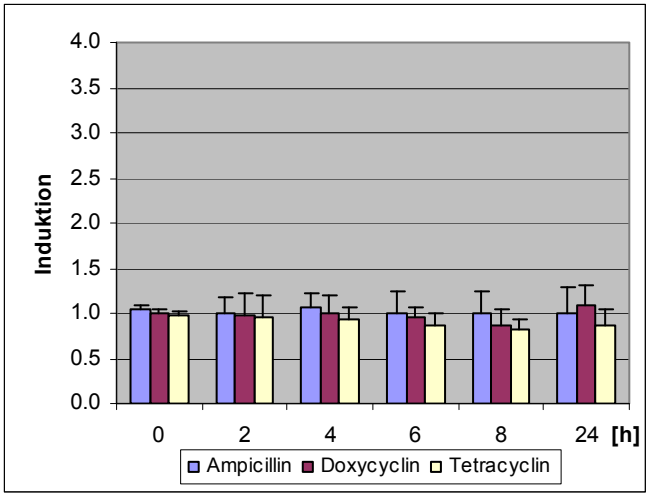


Abb. 2 Induktion des Reporterkonstrukts 5'-URS*(YDL133C-A)::TGFP* (x-fach) in Abhängigkeit des zugesetzten Antibiotikums (100 µg/ml). Exponentiell wachsende Kultur, Proben auf eine optische Dichte von 1.0 bei 600 nm eingestellt. X-Achse = Zeit in Stunden [h].

Weiterhin wurden analog zu den Versuchen mit *S. cerevisiae* Transkriptomanalysen mit *S. pombe* durchgeführt. Tabelle 5 und 6 geben einen Überblick über die erhaltenen Ergebnisse. Unter den gewählten Versuchsbedingungen weist *S. pombe* nur eine geringe Anzahl von Genen auf, die als Antwort auf eine Antibiotikazugabe eine veränderte Transkription zeigen (Tab. 5). Auch die maximale Höhe der Veränderung (Tab. 6) ist - bis auf eine Herunterregulation von SPAC977.05c in drei Antibiotikabehandlungen – gering.

Arzneimittelrückstände werden in den letzten Jahren häufig in analysierten Wasserproben nachgewiesen. Neben Aspirin, Progesteron, Carbamazepin und Propanolol spielen hierbei auch Diclofenac, Ibuprofen und Indomethacin eine besondere Rolle. Daher wurden Transkriptomanalysen von *S. cerevisiae* in Antwort auf die Arzneimittel Diclofenac, Ibuprofen und Indomethacin durchgeführt. Die eingesetzte Konzentration für die Transkriptionsanalysen betrug jeweils 100 µM und die Proben wurden 30 min, 2 und 6

Stunden nach Zugabe analysiert. Exemplarisch für die durchgeführten Microarray Analysen wird die Datenanalyse der Transkriptomuntersuchungen von *S. cerevisiae* in Antwort auf die angeführten Arzneimittel im Detail beschrieben, da sie zur Identifizierung der „pleiotropic drug response/resistance - PDR“ als wichtigem Prozess im Anpassungsverhalten der Hefen führte. Hierdurch wurde es möglich, Sensorhefen zu generieren die eine verstärkte Synthese fluoreszenter Proteine in Antwort auf diese Arzneimittel durchführen.

Tab. 5 Anzahl an regulierten Genen von *S. pombe* in Abhängigkeit des zugesetzten Antibiotikums. Inkubationsdauer 30 Minuten, verwendete Konzentration 100 µg/ml, exponentiell wachsende Kultur, non-coding RNA (ncRNA),

Anzahl an regulierten Genen		
Antibiotikum	**ORF (einschließlich ncRNAs)**	**ncRNA**
Ampicillin	4	0
Doxycyclin	6	2
Vancomycin	2	0
Sulfamycin	1	0
Lincomycin	2	1
Ciproflaxin	6	1

Tab. 6 Maximale Höhe der Genregulation (x-fach) in Abhängigkeit des zugesetzten Antibiotikums (100 µg/ml). Inkubationsdauer 30 Minuten, exponentiell wachsende Kultur

Maximale Höhe der Genregulation (x-fach)		
Antibiotikum	**Hoch**	**Herunter**
Ampicillin	2,0	2,9
Doxycyclin	2,0	3,8
Vancomycin	-	9,2
Sulfamycin	-	11,1
Lincomycin	2,3	11,3
Ciproflaxin	2,1	3,5

Die Zugabe von Diclofenac, Ibuprofen und Indomethacin unter den o.g. Bedingungen führte zu einer sofortigen Wachstumshemmung von *S. cerevisiae* Kulturen (Abb. 3).

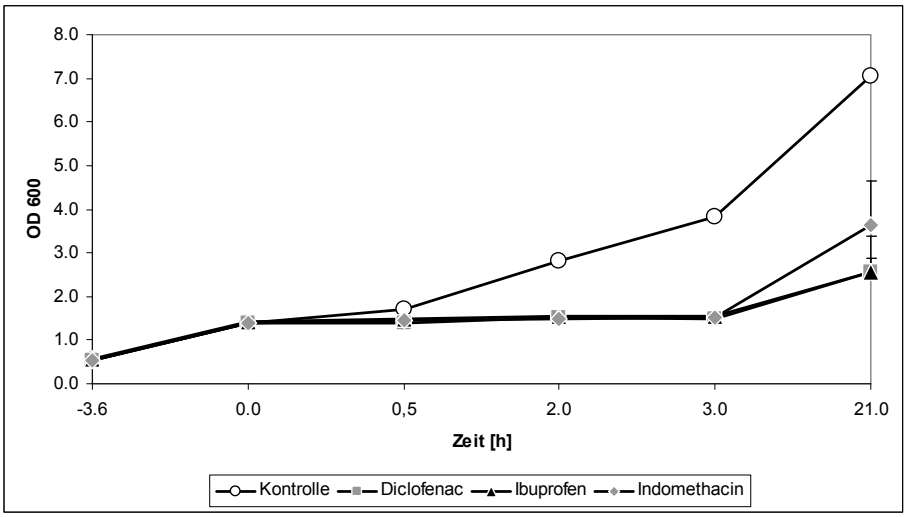


Abb. 3: Wachstumsverhalten von *Saccharomyces cerevisiae* in Antwort auf Diclofenac, Ibuprofen und Indomethacin. Übernachtkulturen wurden auf eine OD 600 von 0.5 verdünnt und 100 µM Arzneistoff oder Ethanol (Endkonzentration 0.5%) zum Zeitpunkt Null hinzugefügt. Kontrolle (offene Kreise), Diclofenac (geschlossene Quadrate), Ibuprofen (geschlossene Dreiecke), Indomethacin (geschlossene Rauten). Wachstum in OD 600 +/- Standardabweichung. Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Microarray-Daten zeigen eine große Anzahl an differenziell regulierten Genen 2 Stunden nach Reizgabe (Tab. 7). Die höchste Anzahl, mit 2947 differentiell regulierten Genen, wurde bei Zugabe von Ibuprofen ermittelt; somit zeigen ungefähr die Hälfte aller in *S. cerevisiae* vorhandenen Gene eine differentielle Regulation unter diesen Bedingungen. In allen Behandlungen war jeweils ca. die Hälfte aller differentiell regulierten Gene hoch- bzw. herunter reguliert. Teilweise wurden sehr starke Induktionsraten der Transkription festgestellt, mit einem Maximalwert von 364-facher Hochregulation in Antwort auf Ibuprofenzugabe.

Tab. 7: Anzahl an differentiell regulierten Genen in Antwort auf die Arzneistoffe Diclofenac, Ibuprofen und Indomethacin

Anzahl an differentiell regulierten Genen mit Induktionswerten > 1.5 [a]			
	Total	*Hoch regulierte Gene*	*Herunter regulierte Gene*
Diclofenac	560	269	295
Ibuprofen	2947	1466	1481
Indomethacin	403	196	207

[a] p-value < 0.01

Untersuchungen zur Überschneidung aller signifikant regulierten Gene und Darstellung der Ergebnisse mittels eines „Venn Diagrams“ ergaben, dass 174 Gene in Antwort auf alle drei untersuchten Arzneimittel differentiell reguliert sind (Abb. 4). Spezifisch für Diclofenac sind 123 Gene, für Indomethacin 43 Gene und für Ibuprofen 2568 Gene differentiell reguliert. Die

Arzneistoff-spezifisch regulierten Gene für Diclofenac und Indomethacin wurden in weiteren Analysen genauer untersucht. Es konnte keine direkte Zuordnung zum gesetzten Reiz festgestellt werden, da die differentiell regulierten Gene überwiegend in generelle Synthesewege eingebunden waren (siehe GO Analyse).

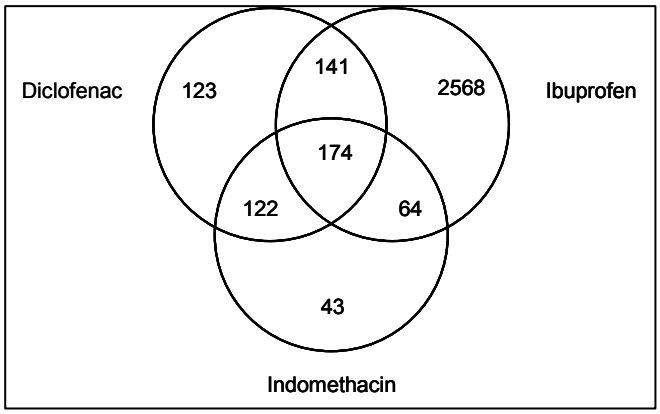


Abb. 4. Überschneidung aller signifikant regulierten Gene (Venn Diagram, $p < 0.01$) mit Induktionswerten > 1.5 in Antwort auf Diclofenac, Ibuprofen und Indomethacin.

Weiterhin wurde eine vertiefte Datenanalyse unter Verwendung der Analysesoftware T-Profiler (http://www.t-profiler.org/) durchgeführt Sie ermöglichte eine Zuordnung der differentiell regulierten Gene zu definierten GO (Gene ontology) Kategorien (Tab. 8). So wurde beispielsweise eine signifikante Hochregulation der Genexpression im Bereich der Aminosäure-Biosynthese bei Gabe von Diclofenac und Indomethacin festgestellt, nicht jedoch von Ibuprofen. Dort wurde eine entsprechende Regulation im Bereich des Stickstoffmetabolismus festgestellt. Während die Ibuprofenzugabe zu einer verstärkten Expression von Genen mit Funktionen im Proteinabbau und zu einer verminderten Expression von Genen mit Zuordnung zur Proteinbiosynthese führte, wurden diese Regulationen bei Behandlung mit Diclofenac und Indomethacin nicht festgestellt. Für die Generierung von Biosensoren mittels induzierter Synthese fluoreszenter Proteine ist eine funktionierende Proteinbiosynthese notwendig. Die erhaltenen Daten könnten darauf hinweisen, dass es bei Ibuprofengabe - trotz starker Induktion der Transkription - möglicherweise nur geringe Induktionsraten der generierten Biosensoren kommen könnte.

Tab. 8: GO (Gene ontology) Kategorien. Zuordnung der Gene, deren Expressionsstärken in Antwort auf Diclofenac, Indomethacin und Ibuprofen signifikant verändert sind, zu GO Kategorien. Aspect: C, component; P, process; F, function. T- und E- Wert Kalkulation wurde mittels T-profiler unter Verwendung des vollständigen Datensatzes durchgeführt.

Diclofenac					
Category	*Aspect*	*t-value*	*E-value*	*Mean*	*ORFs*
cytosolic ribosome	C	9.8	< 1.0E-15	0.35	151
amino acid biosynthesis	P	6.2	8.4E-07	0.28	99
endoplasmic reticulum	C	5.5	4.5E-05	0.12	351
purine base metabolism	P	-4.6	6.4E-03	-0.59	15
mitochondrion	C	-6.9	7.8E-09	-0.14	634
nucleolus	C	-7.2	1.0E-09	-0.26	190

Ibuprofen					
Category	*Aspect*	*t-value*	*E-value*	*Mean*	*ORFs*
cellular_component unknown	C	13.0	< 1.0e-15	1.05	677
heat shock protein activity	F	6.6	5.3E-08	3.05	15
protein catabolism	P	6.1	1.4E-06	1.04	136
nitrogen metabolism	P	5.0	9.8E-04	1.52	36
peroxisome	C	4.6	6.4E-03	1.18	55
spore wall assembly (sensu Fungi)	P	4.5	1.0E-02	1.86	19
response to stress	P	4.3	2.5E-02	0.57	354
chromosome	C	-4.2	3.2E-02	-0.28	173
methyltransferase activity	F	-4.4	1.6E-02	-0.56	73
bud neck	C	-4.4	1.5E-02	-0.44	99
protein-nucleus import	P	-4.8	2.4E-03	-0.88	45
translation factor activity, nucleic acid binding	F	-4.8	2.2E-03	-0.84	47
protein biosynthesis	P	-5.8	9.2E-06	-0.18	442
nucleobase metabolism	P	-5.9	4.5E-06	-1.52	29
cell proliferation	P	-6.5	1.1E-07	-0.19	536
ribosome biogenesis	P	-7.9	3.9E-12	-0.71	176
tRNA modification	P	-8.6	< 1.0e-15	-1.59	58
cytosolic ribosome (sensu Eukarya)	C	-19.0	< 1.0e-15	-2.18	151
nucleolus	C	-19.9	< 1.0e-15	-2.15	190
intracellular	C	-20.1	< 1.0e-15	-0.27	4181

Indomethacin					
Category	*Aspect*	*t-value*	*E-value*	*Mean*	*ORFs*
cytosolic ribosome (sensu Eukarya)	C	10.9	< 1.0E-15	0.36	151
amino acid biosynthesis	P	8.1	7.7E-13	0.32	99
endoplasmic reticulum	C	5.1	5.5E-04	0.11	351
electrochemical potential-driven transporter activity	F	4.3	2.2E-02	0.33	30
oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of donors	F	-4.3	2.8E-02	-0.65	9
carbohydrate metabolism	P	-4.8	2.6E-03	-0.15	179
purine base metabolism	P	-4.8	2.1E-03	-0.54	15
nucleolus	C	-5.6	2.7E-05	-0.17	190
mitochondrion	C	-8.5	< 1.0E-15	-0.15	634

Mit einem zusätzlichen, von T-Profiler zur Verfügung gestellten Analysentool wurden Konsensus-Motive für die Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren in den regulatorischen Bereichen der differentiell regulierten Gene ermittelt (Tab. 9).

Tab. 9. Konsensus Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren in den 5'-Bereichen differentiell regulierter Gene in Antwort auf Diclofenac, Ibuprofen und Indomethacin.

Diclofenac				
Motif	*t-value* [a]	*E-value* [a]	*Mean*	*ORFs*
MBP1	6.2	6.4E-08	0.15	289
GCN4	4.7	4.9E-04	0.19	111
Unknown (PDR)	3.9	1.4E-02	0.18	84
SWI4	3.7	3.2E-02	0.07	341
PAC	-5.5	6.2E-06	-0.18	246

Indomethacin				
Motif	*t-value*	*E-value*	*Mean*	*ORFs*
MBP1	6.9	7.1E-10	0.16	289
GCN4	6.3	4.1E-08	0.24	111
SWI4	4.3	2.5E-03	0.09	341
Unknown (PDR)	4.0	1.0E-02	0.18	84
PAC	-4.1	6.3E-03	-0.11	246

Ibuprofen				
Motif	*t-value* [a]	*E-value* [a]	*Mean*	*ORFs*
MSN2-4	10.4	< 1.0E-15	0.51	906
TBP	8.9	< 1.0E-15	0.17	2787
MSN2-4	8.7	< 1.0E-15	0.42	934
PDR3	7.9	3.7E-13	1.67	65
HSF1	7.7	2.7E-12	1.03	151
Unknown (PDR)	7.0	3.7E-10	1.29	84
TBP	5.8	1.2E-06	0.23	1136
RPN4	5.5	7.4E-06	0.98	87
Unknown (PDR)	5.4	7.8E-06	1.05	76
RLM1	5.3	1.4E-05	0.44	361
HSF1	5.2	2.5E-05	0.64	179
GCN4	5.2	3.2E-05	0.82	111
RCS1	4.8	2.0E-04	0.35	442
MSN2/4	4.7	4.6E-04	0.51	219
CRZ1	4.4	1.8E-03	0.70	108
sporulation	4.3	2.1E-03	0.77	89
HSF1	4.0	1.0E-02	1.06	41
UPC2	3.9	1.7E-02	0.39	245
MSE	3.8	2.2E-02	0.18	826
PUT3	3.7	2.8E-02	0.53	130
YAP5	3.7	2.8E-02	0.73	73
Unknown	3.7	3.0E-02	0.45	173
GCN4	3.7	3.8E-02	0.34	286
RAD	3.7	3.8E-02	0.95	43
CIN5	3.6	3.9E-02	0.52	129
SFF	-3.7	2.7E-02	-0.52	166
REB1	-3.8	1.9E-02	-0.41	284
FKH1	-4.7	4.9E-04	-0.49	289
rRNA?	-6.2	8.8E-08	-2.97	15
RAP1	-6.4	1.9E-08	-0.70	261
PAC	-12.2	< 1.0E-15	-1.33	246
rRPE	-15.6	< 1.0E-15	-0.67	1274

Die Analyse ergab für alle drei untersuchten Arzneistoffe eine signifikante Anreicherung an differentiell regulierten Genen mit Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die an der „pleiotropic drug response/resistance (PDR)“ beteiligt sind. Hierzu gehören u.a. Gene wie *PDR5*, die für transmembrane Transporterproteine kodieren.

PDR5 kodiert einen ATP-bindenden Transporter in der Plasmamembran, der am Transport von Arzneimitteln beteiligt ist und eine wichtige Funktion bei der Detoxifizierung der Hefezellen während der exponentiellen Wachstumsphase übernimmt.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die 5'-URS von *PDR5* kloniert und für die Generierung von Reporterkonstrukten verwendet. Durch Transformation des erzeugten Konstruktes in *S. cerevisiae* wurden Sensorzellen generiert, die im Folgenden hinsichtlich ihrer Induktion durch die untersuchten Arzneimittel getestet wurden (Tab. 10). Zusätzlich wurden weitere 5'-URS kloniert und getestet, von denen exemplarisch in der Tabelle noch

die Ergebnisse für *YOR1* und *TPO1* aufgeführt sind, die beide Transporter in der Plasmamembran kodieren.

A1-1-2: Klonierung von spezifisch regulierten Promotoren, Vektorherstellung

Es wurden Reporterkonstrukte für *S. cerevisiae* generiert, die eine Antwort auf die Antibiotika Bleomycin, Novobiocin, Tetracyclin, Doxycyclin und Oxytetracyclin zeigen. Darüber hinaus ergaben die durchgeführten Transkriptomanalysen, dass auffallend viele Gene, die für Transporter codieren, eine veränderte Genexpression aufwiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse und zusätzlicher Literaturrecherchen wurden ebenfalls Reporterkonstrukte unter Verwendung der regulatorischen Sequenzen von Transportern generiert und im Bioassay deren Antwort auf verschiedene Arzneistoffe getestet.

In Tab. 10 sind die generierten Sensorhefen und ihre Induzierbarkeit durch verschiedene Antibiotika bzw. Arzneimittel (Schadstoff) dargestellt.

Tab. 10 Generierte Sensorhefen und Ergebnisse der Bioassays.

5URS	5URS (Genname)	Reporter	Schadstoff	Schadstoff-konzentration	Max. Signalstärke (x-fach)
YMR279C		TGFP-yEGFP3-CLN2-pest	Ampicillin, Doxycycline, Tetracycline	100 µg/ml	-
YML058w-a	HUG1long	TGFP-yEGFP3-CLN2-pest	Bleomycin	1 - 100 µg/ml	2 - 3
YDL133C-A	RPL41B	TGFP-yEGFP3-CLN2-pest	Ampicillin, Doxycycline, Tetracycline	10, 100 µg/ml	-
		yEGFP3-CLN2-pest	Diclofenac	50, 100 µg/ml	0,3
YBR040W	FIG1	eGFP	Novobiocin	100 µg/ml	7 - 15
		eGFP	Tetracycline, Doxycyclin, Oxytetracyclin	100 µg/ml	2 - 4
YLL028W	TPO1	TGFP-yEGFP3-CLN2-pest	Diclofenac, Ibuprofen	25, 50, 100 µM	2 - 3,5
		TGFP-yEGFP3-CLN2-pest	Aspirin	100 - 10.000 µM	-
YOR153W	PDR5	TGFP-yEGFP3-CLN2-pest	Diclofenac	5 - 100 µM	15 - 20
			Ibuprofen	100 µM	3 - 5
			Progesterol	100 µM	10
YGR281W	YOR1	TGFP	Diclofenac	100 µM	6 - 12
			Ibuprofen	100 µM	2 - 5

Nachfolgend werden exemplarisch einige Diagramme zur Induktion der erzeugten Sensorhefen gezeigt. Abb. 5 zeigt die Induktion einer Sensorhefe durch 100 µM Diclofenac. Die Induktion ist in Abhängigkeit vom Lösungsmittel unterschiedlich stark.

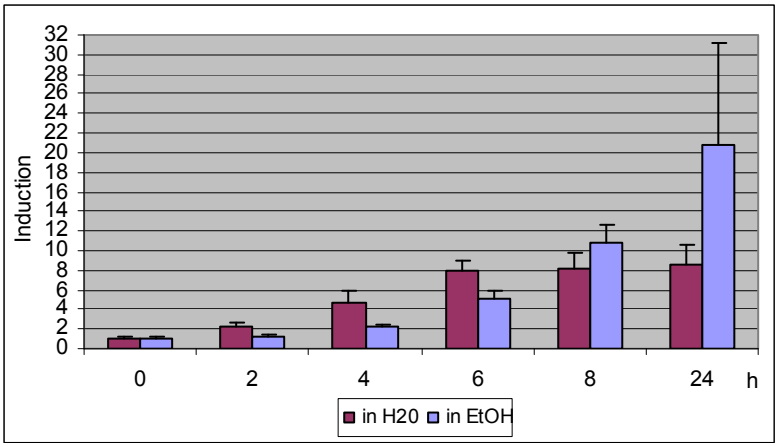


Abb. 5 Induktion des Reporterkonstrukts 5'-URS(*PDR5*)::*TGFP* (x-fach) bei Zugabe von Diclofenac (100 µM). Exponentiell wachsende Kultur, Proben auf eine optische Dichte von 1.0 bei 600 nm eingestellt. Diclofenac in Wasser (H2O) oder Ethanol (EtOH) gelöst.

Abb. 6 zeigt die Induktion der gleichen Sensorhefe durch unterschiedliche Konzentrationen an Diclofenac (0,1 – 50 µM). Ein Nachweis von Diclofenac ist unter diesen Bedingungen bis zu einer Konzentration von 5 µM möglich.

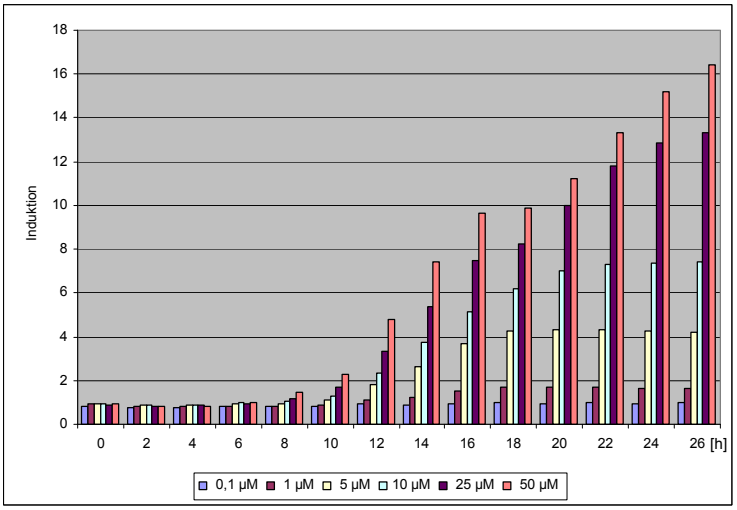


Abb. 6 Induktion des Reporterkonstrukts 5'-URS(*PDR5*)::*TGFP* (x-fach) bei Zugabe von verschiedenen Diclofenac-Konzentrationen (0,1 - 50 µM). Exponentiell wachsende Kultur, Proben auf eine optische Dichte von 1.0 bei 600 nm eingestellt. Diclofenac in Ethanol gelöst.

Abb. 7 zeigt die Induktion des Reporterkonstrukts 5'-URS(*PDR5*)::*TGFP* durch Indomethacin, Diclofenac und Ibuprofen in einem Hefestamm, bei dem der Leserahmen für den „multidrug transporter" *SNQ2* deletiert ist.

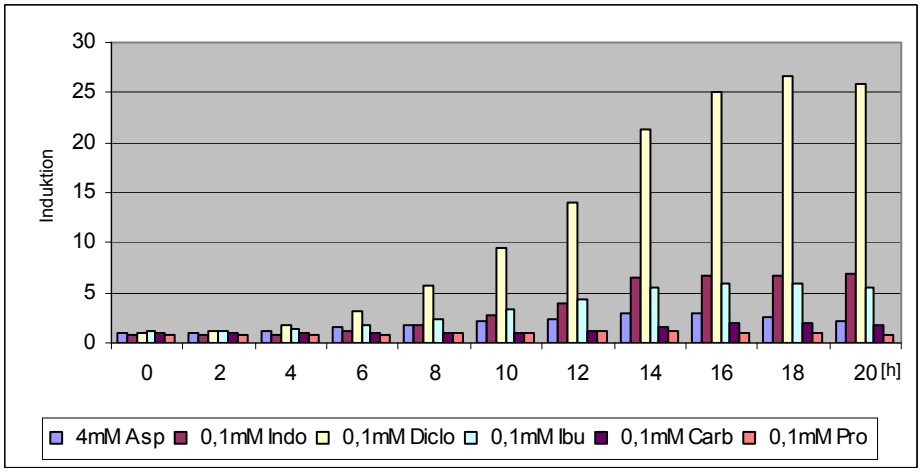


Abb. 7 Induktion des Reporterkonstrukts 5'-URS(*PDR5*)::*TGFP* (x-fach) im Deletionsstamm *Δsnq2* bei Zugabe von verschiedenen Arzneimittelstoffen in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 mM bzw. 4 mM). Exponentiell wachsende Kultur, Proben auf eine optische Dichte von 1.0 bei 600 nm eingestellt. Arzneimittelstoffe in Ethanol gelöst. Asp: Aspirin, Indo: Indomethacin, Diclo: Diclofenac, Ibu: Ibuprofen, Carb: Carbamazepin, Pro: Propranolol.

Der Meilenstein M3 „Identifizierung und Klonierung eines Schad- oder Arzneistoff induzierbaren Promotors in einen Hefevektor" wurde fristgerecht erreicht.

A 1-2: Sensoren für intrazellulare Kupferionen

A 1-2-1: Herstellung von Konstrukten zur erhöhten Expression der hoch affinen Kupfertransporter Ctr1p und Ctr3p

Es sollten Gene identifiziert werden, deren mRNA Konzentration bei Kupferakkumulation stark erhöht ist. Dafür wurden Hefen generiert, die eine erhöhte Aufnahme und Bindekapazität für Kupfer aufweisen. Mittels PCR wurden folgende Konstrukte erstellt:

Konstrukt	**Bemerkung**
CTR1	vollständiger Leserahmen
*CTR1HA*intern	vollständiger Leserahmen, zwischen AS 119 und 120 3x Hämagglutinin-Epitop (HA-Tag)
CTR1Δ300	Deletion des C-Terminus nach AS 299
CTR1HAΔ300	Deletion des C-Terminus nach AS 299, zwischen AS 119 und 120 3x HA-Tag
CTR3HA	vollständiger Leserahmen, 3x HA-Tag am C-Terminus

Die Amplifizierung der Leserahmen für *CTR1* und *CTR3* erfolgte aus der genomischen DNA von *S. cerevisiae*. Das 3x Hämagglutinin-Epitop (HA-Tag) wurde mittels OEP (Overlap-Extension-PCR) eingefügt bzw. angefügt. Die Amplifikate wurden in das Multicopy -Plasmid p425GPD bzw. für alle *CTR1* Amplifikate zusätzlich in das Slinglecopy-Plasmid p415ADH kloniert.

Diese Plasmide besitzen das *LEU2* Gen zur Selektion in Hefe sowie den starken konstitutiven *GPD1*- Promotor bzw. den konsitutiven *ADH1*- Promotor mittlerer Stärke. Die Plasmide wurden in *E. coli* vervielfältigt und danach in den *S. cerevisiae*-Stamm BY4741 bzw. BY4741*Δctr1* transformiert. Die Expression der Proteine wurde durch Western Blot und Immunodetektion erfolgreich nachgewiesen (Abb. 8).

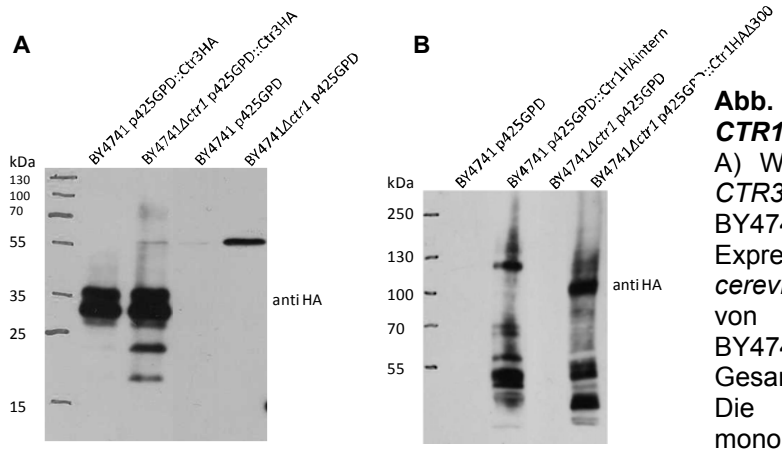


Abb. 8: Expression von Ctr3HAp, *CTR1HA*intern und Ctr1Δ300p
A) Western Blot nach Expression von *CTR3HA* in *S. cerevisiae* BY4741 bzw. BY4741*Δctr1*. B) Western Blot nach Expression von *CTR1HA*intern in *S. cerevisiae* BY4741 und nach Expression von *CTR1Δ300* in *S. cerevisiae* BY4741*Δctr1*. Es wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein an Zelllysat aufgetragen. Die Detektion erfolgte durch einen monoklonalen HA-Antikörper.

Ctr3HAp konnte in beiden Hefestämmen bei 33 kDa detektiert werden, was dem errechneten Molekulargewicht entspricht. Das berechnete Molekulargewicht von Ctr1HAintern entspricht

48 kDa. Aufgrund starker Glycosylierung läuft es bei der denaturierenden Gelelektrophorese jedoch bei ca. 105 kDa (Ooi *et al.,* 1996). Das verkürzte Ctr1HAΔ300p wurde aufgrund des fehlenden C-Terminus bei einem kleineren Molekulargewicht detektiert. Des Weiteren wurden bei beiden Western-Analysen mögliche Degradationsprodukte der jeweiligen Proteine sowie unspezifische Reaktionen des Antikörpers mit Hefeproteinen bei ca. 55 kDa detektiert.

Das Wachstum der generierten Hefestämme wurde zunächst wurde auf SC (Synthetic Complete)-Agarplatten mit Kupferkonzentrationen von 0 mM – 2 mM untersucht (Abb. 9).

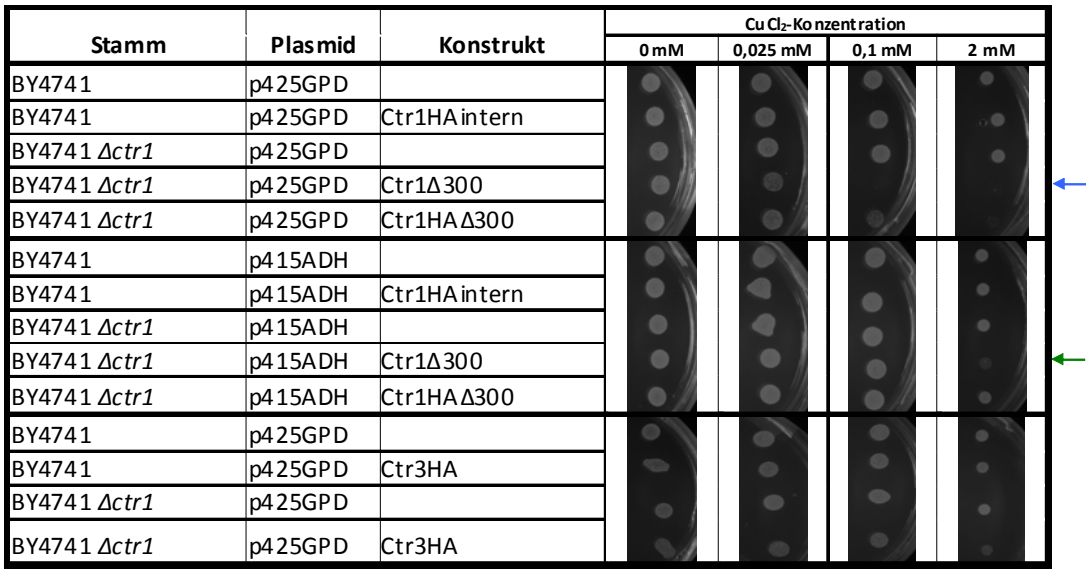


Abb. 9: Wachstumsverhalten von Ctr1p und Ctr3p exprimierenden Stämme in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Kupfer. Je 5 µl Zellsuspension (OD_{600} = 0,125) einer Übernachtkultur wurden auf SC-Agar mit in den angegeben Konzentrationen an zugesetztem $CuCl_2$ ausgebracht. Die Agarplatten wurden 1 Tag bei 30 °C inkubiert Angegeben sind die verwendeten Plasmide (Spalte 2) sowie die rekombinanten Proteine (Spalte 3). Grüner Pfeil: moderate Wachstumshemmung; blauer Pfeil: starke Wachstumshemmung

Es wird deutlich, dass sowohl bei starker als auch schwacher konstitutiver Expression eine Wachstumshemmung der Deletionsstämme, die das verkürzte Ctr1p exprimieren, zu verzeichnen ist, was ggf. auf eine erhöhte Kupferaufnahme und -konzentration in der Zelle hinweisen könnte, die sich toxisch auf den Organismus auswirkt. Bei starker konstitutiver Expression (p425GPD, blauer Pfeil) unterbleibt das Wachstum schon bei einer Konzentration von 0,1 mM, wohingegen dieser Effekt bei schwacher konstitutiver Expression (p415ADH, grüner Pfeil) erst ab einer Konzentration von 2 mM zu beobachten ist. In folgenden Versuchen wurden nur noch Konstrukte mit starker konstitutiver Expression verwendet.

Auch bei Wachstumsversuchen in SC-Flüssigmedium mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen (0,025 – 2 mM). zeigten Ctr3p-exprimierende Hefen nur eine schwache Wachstumshemmung. Daher wurden diese im Weiteren vernachlässigt. Auf die konkreten

Ergebnisse aus den Wachstumsanalysen in Flüssigkultur wird im Abschnitt A 1-2-3 näher eingegangen.

A 1-2-2: Herstellung von Konstrukten zur erhöhten Expression des intrazellularen Kupfer-Chaperons Atx1p und der Kupfer-ATPase Ccc2p

Aus genomischer *S. cerevisiae* DNA wurdn die Leserahmen für das Kupfer-Chaperon Atx1p und die Kupfer-ATPase Ccc2p PCR-amplifiziert. An den C-Terminus von *ATX1* wurde ein einfacher HA-Tag fusioniert. Durch OEP erfolgte die Anfügung eines 3x HA-Tags an den C-Terminus von *CCC2*. Die Amplifikate wurden in Shuttle-Plasmide kloniert, die sich bezüglich ihrer auxotrophen Marker (p426GPD: *URA3*-Gen; p423GPD: *HIS3*-Gen) unterschieden, um eine gleichzeitige Expression mehrerer Proteine in einer Hefezelle zu ermöglichen. Die Plasmide wurden in *E. coli* vervielfältigt und separat in *S. cerevisiae* BY4741 transformiert. Die Expression der Proteine wurde mittels Western Blot und anschließender Immunodetektion erfolgreich nachgewiesen (Abb. 10).

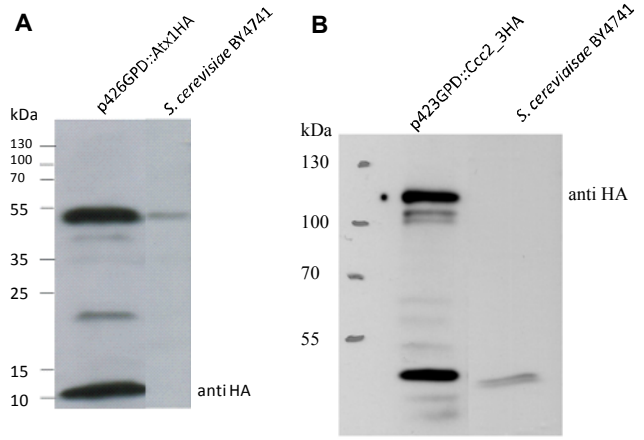


Abb. 10: Expression von Atx1HAp und Ccc2_3HAp. A) Western Blot nach Expression von Atx1HAp in *S. cerevisiae* BY4741. Es wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein an Zelllysat aufgetragen. B) Western Blot nach Expression von Ccc2_3HAp in *S. cerevisiae* BY4741. Es wurden jeweils 15 µg Gesamtprotein an Zelllysat aufgetragen. Die Detektion erfolgte durch einen monoklonalen HA-Antikörper.

Die Größe der Proteinbande von AtxHAp entspricht dem errechneten Molekulargewicht von 9 kDa (Abb. 6 A). Die Position der Proteinbande von Ccc_3HAp ist in Übereinstimmung mit dem errechneten Molekulargewicht von 110 kDa (Abb. 6 B). Weiterhin wurden in beiden Western Blots unspezifische Reaktionen des Antikörpers mit dem verwendeten Hefestamm (bei ~55 kDa) sowie mögliche Degradationsprodukte detektiert.

A 1-2-3: Herstellung rekombinanter Hefen mit erhöhter Kupferaufnahme und –bindekapazität

Um Hefestämme mit einer erhöhten Kupferaufnahme sowie Kupferbindefähigkeit zu erzeugen, wurden die Proteine Ctr1p, Atx1p sowie Ccc2p überexprimiert. Durch Überexpression von Ctr1p sollte ein erhöhter Kupfertransport in die Zelle erreicht werden. Da Atx1p, ein Kupferbindeprotein, ebenfalls überexprimiert wird und überschüssige Kupferionen bindet, sollte ein möglicher toxischer Effekt für die Zelle in gewissem Maße wieder aufgehoben werden. Durch Ccc2p sollte der Kupfertransport aus dem Cytosol in das trans-

Golgi-Netzwerk erfolgen. Es wurde vermutet, dass die toxische Wirkung des Kupfers eine Wachstumshemmung zur Folge hat, die man bei Überexpression von Ctr1p erkennen würde. Durch gleichzeitige Überexpression von Atx1p und Ccc2p sollte diese Wachstumhemmung wieder reduziert werden. Aus den Ergebnissen zahlreicher Vorversuche ging hervor, dass die Überexpression von Ccc2p zu keiner zusätzlichen Verbesserung des Wachstums führte. Daher wurde dieser Aspekt in anschließenden Untersuchungen nicht weiter verfolgt.

Um die Wirkung des Kupfers auf das Wachstum zu untersuchen, wurden zunächst Wachstumsanalysen in SC-Flüssigkulturen, welche Kupferkonzentrationen von 0,025 mM bis 2 mM $CuCl_2$ enthielten, durchgeführt. Dafür wurden folgende Hefestämme generiert:

Stamm	**Plasmid(e)**
BY4741*Δctr1*	p425GPD
BY4741*Δctr1*	p425GPD::Ctr1Δ300
BY4741*Δctr1*	p425GPD / p426GPD
BY4741*Δctr1*	p425GPD::Ctr1Δ300 / p426GPD::Atx1HA
BY4741	p425GPD
BY4741	p425GPD::Ctr1
BY4741	p425GPD / p426GPD
BY4741	p425GPD::Ctr1 / p426GPD::Atx1HA

In ersten Wachstumsanalysen zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 2 mM $CuCl_2$ kein Wachstum der Hefen mehr stattfindet (nicht gezeigt). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die gewünschte Verbesserung des Wachstums bei gleichzeitiger Überexpression von Ctr1p und Atx1p mit steigenden Kupferkonzentrationen im Kulturmedium abnimmt (nicht gezeigt). Das heißt, je höher die Kupferkonzentration ist, desto weniger erfolgt eine Kompensation der toxischen Wirkung durch Atx1p. Anhand dieser Ergebnisse wurden die Untersuchungen der generierten Hefen hinsichtlich ihrer selektiven Kupferbindefähigkeit bei einer Kupferkonzentration von 0,025 mM $CuCl_2$ durchgeführt.

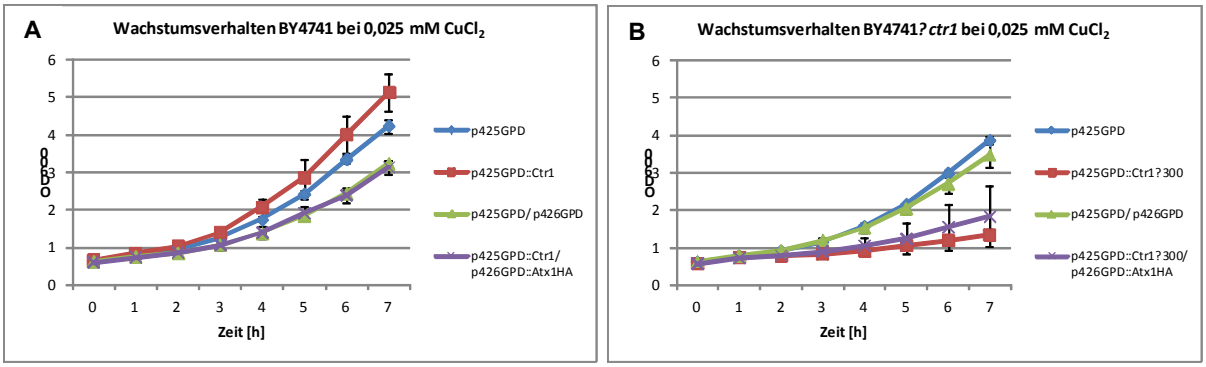


Abb. 11: Wachstumskurven der generierten Hefestämme unter Zusatz von 0,025 mM $CuCl_2$.
A) Vergleich des Wachstumsverhaltens des Stammes BY4741 p425GPD::Ctr1 und des Doppelexpressionsstammes BY4741 p425GPD::Ctr1 / p426GPD::Atx1HA. B) Vergleich des Wachstumsverhaltens des Hefestammes BY4741*Δctr1* p425GPD::Ctr1Δ300 und des Doppelexpressionsstammes BY4741*Δctr1* p425GPD::Ctr1Δ300 / p426GPD::Atx1HA.

Abb. 11 A) zeigt, dass das Wachstum des Stammes BY4741 p425GPD::Ctr1 bei einer Kupferkonzentration von 0,025 mM $CuCl_2$ im Kulturmedium nicht gehemmt ist, sondern im Vergleich zum Kontrollstamm mit dem leeren Plasmid erhöht ist. Eine zusätzliche Expression von Atx1p in dem Stamm BY4741 p425GPD::Ctr1 / p426GD::Atx1HA führt im Vergleich zu dem Kontrollstamm, der die beiden leeren Plasmide trägt, zu keinem unterschiedlichen Wachstum. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es hier zu keiner erhöhten Kupferaufnahme kommt. Dagegen ist im *Δctr1* Stamm bei Überexpresssion von *CTR1Δ300* und bei gleichzeitiger Überexpression von *Ctr1Δ300* und *ATX1HA* eine deutliche Wachstumshemmung (Abb. 9 B) im Vergleich zun Kontrollstämmen zu verzeichnen. Bei dem Stamm, der sowohl *CTR1Δ300* als auch *ATX1HA* exprimiert, konnte ein leicht verbessertes Wachstumsverhalten festgestellt werden. Dieses Verhalten war allerdings auf Grund hoher Standardabweichungen nicht signifikant. Des Weiteren ging aus den Vorversuchen hervor, dass bei gleichzeitiger Überexpression von *CTR1Δ300*, *ATX1HA* sowie *CCC2_3HA* keine signifikante Verbesserung des Wachstums zu verzeichnen war. Daher wurden im Weiteren nur die Überexpression von Ctr1p (*CTR1*) im WT (BY4741) und die Überexpression des verkürzten Ctr1p (*CTR1Δ300*) im *Δctr1* Stamm untersucht.

Die Wachstumshemmung bei Überexpression von *CTR1Δ300* wurde als Zeichen für eine verstärkte Kupferaufnahme gewertet. Wie oben ausgeführt, ergab sich bei Überexpression von *CTR1* ein verbessertes Wachstum. Es wurde bereits gezeigt, dass der C-Terminus von Ctr1p eine regulatorische Rolle spielt, um die Zelle vor toxischen Kupferkonzentrationen zu schützen (Wu *et al.*, 2009).

Um den tatsächlichen Kupfergehalt in den Hefezellen zu ermitteln, wurden in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Chemische Physik fester Stoffe Messungen mittels ICP-OES („Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry“) und ICP-MS („Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry“) durchgeführt. Die Wachstumskurven der hierfür verwendeten Kulturen sind in Abb. 12 dargestellt. Nach 7-stündigem Wachstum wurden die Zellen geerntet und mit Analysenwasser gewaschen. Gemessen wurden je 2-3 Proben mit 5 mg Zelltrockengewicht aus drei unabhängigen Wachstumsversuchen. Jede dieser Proben wurde 5-fach mittels ICP-OES und ICP-MS gemessen.

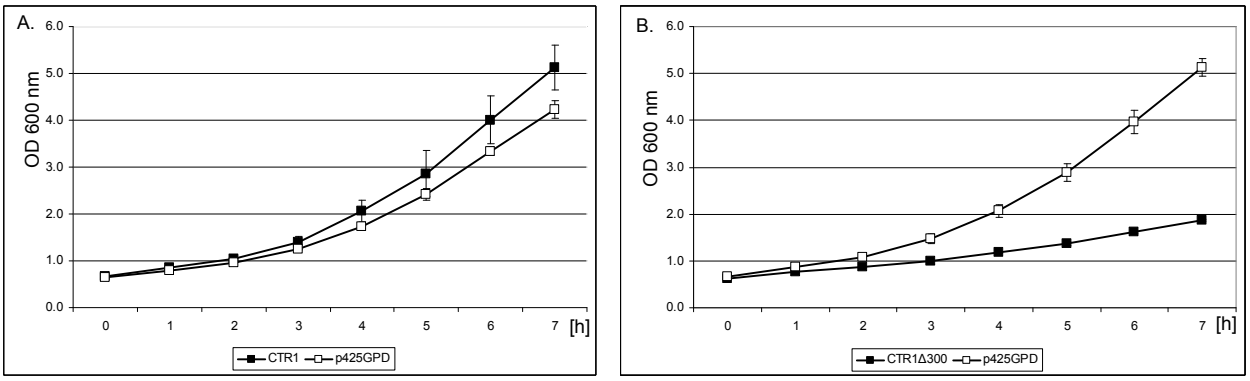


Abb. 12: Wachstumsverhalten der generierten Stämme zur Untersuchung mittels ICP-OES und ICP-MS. A. Überexpression von Ctr1p (*CTR1*) im WT (BY4741) und B. Überexpression des verkürzten Ctr1p (*Ctr1Δ300)* im *Δctr1* Stamm. Die Kontrollstämme enthielten jeweils das leere Plasmid. SC Medium (-leu) plus 0.02 mM $CuCl_2$.

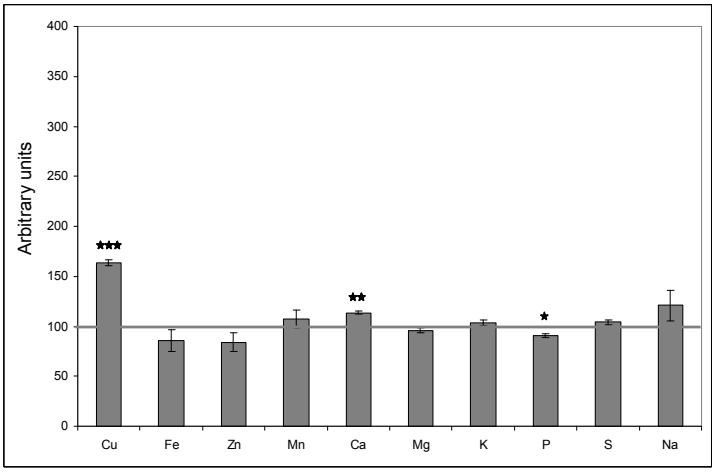


Abb. 13: ICP-OES und ICP-MS Analyse. Elementprofil der WT Zellen, die *CTR1* überexprimieren. Zellen wurden für 7 Stunden auf SC-leu Medium kultiviert, dem 0.02 mM $CuCl_2$ zugesetzt war. Die Werte sind relativ zum Kontrollstamm dargestellt (enthielt das leere Plasmid p425GPD), dessen Absolutwerte auf 100 gesetzt wurden. Die absoluten Elementkonzentrationen für den Kontrollstamm waren: (mg g−1) Mg 3.5, K 22.7, P 26.7, S 3.4; und (µg g−1) Cu 285, Fe 41.7, Zn 71.7, Mn 3.9, Ca 195, Na 11. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert ± der Standardabweichung aus 3 unabhängigen biologischen Experimenten, wobei jede dieser Proben in 2-3 Proben aufgeteilt und jeweils mit 5 Widerholungen mittels ICP-OES und ICP-MS gemessen wurden. Für die statistische Analyse wurde der „Student's t-test" verwendet. Die Kupferkonzentration in *CTR1* überexprimierenden Zellen war signifikant unterschiedlich zum Kontrollstamm bei $P < 0.001$. Für Calcium war $P < 0.01$, und für Phosphor war $P < 0.05$.

.

Aus Abb. 13 wird ersichtlich, dass auch bei Überexpression des Volllängen *CTR1* eine Kupferanreicherung stattfindet. Die Werte des angereicherten Kupfers konnten jedoch deutlich erhöht werden, wenn *CTR1Δ300* unter den gleichen Bedingungen überexprimiert wurde (Abb. 14.)

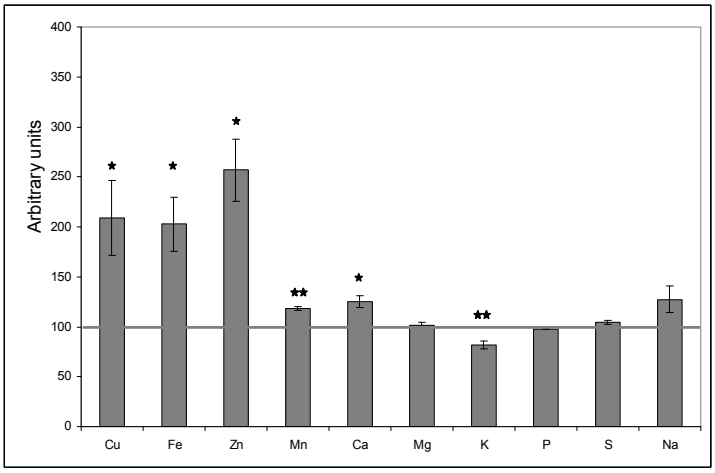


Abb. 14: ICP-OES und ICP-MS Analyse. Elementprofil der *Δctr1* Zellen, die *CTR1Δ300* überexprimieren. Zellen wurden für 7 Stunden auf SC-leu Medium kultiviert, dem 0.02 mM $CuCl_2$ zugesetzt war. Die Werte sind relativ zum Kontrollstamm mit dem leeren Plasmid p425GPD dargestellt, dessen Absolutwerte auf 100 gesetzt wurden. Die absoluten Elementkonzentrationen für den Kontrollstamm waren: (mg g−1) Mg 3.4, K 21.7, P 26.7, S 3.4; und (µg g−1) Cu 315, Fe 71, Zn 74, Mn 4.4, Ca 253, Na 21.3 Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert ± der Standardabweichung aus 3 unabhängigen biologischen Experimenten, wobei jede dieser Probe in 2-3 Proben aufgeteilt und jeweils mit 5 Widerholungen mittels ICP-MS gemessen wurden. Für die statistische Analyse wurde der „Student's t-test" verwendet. Die Kupfer-, Eisen-, Zink- und Calciumkonzentrationen in *CTR1Δ300* überexprimierenden Zellen waren signifikant unterschiedlich zum Kontrollstamm bei $P < 0.05$. Für Mangan und Kalium war $P < 0.01$.

Es konnte eine starke Anreicherung von Kupfer, Eisen und Zink unter diesen Bedingungen festgestellt werden. Daneben wurde auch Mangan und Calcium verstärkt akkumuliert, während die Menge an Kalium verringert war. Auffällig war die größere Standardabweichung in diesem Versuchsansatz. Somit konnten erfolgreich Hefen generiert werden, die eine erhöhte Kupferaufnahme und –bindekapazität aufweisen. Tab. 11 gibt eine Zusammenfassung der Absolutwerte für Elemente mit signifikantem Unterschied zum Kontrollstamm.

Tab. 11: Elementprofil von *CTR1* überexprimierenden WT Zellen und *CTR1Δ300* überexprimierenden *Δctr1* Zellen. Die Zellen wurden für 7 Stunden auf SC-leu Medium kultiviert, dem 0.02 mM $CuCl_2$ zugesetzt war. Absolutwerte sind gezeigt für die Elemente, deren Unterschiede zum Kontrollstamm signifikant waren. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert ± der Standardabweichung aus 3 unabhängigen biologischen Experimenten, wobei jede dieser Probe in 2-3 Proben aufgeteilt und jeweils mit 5 Widerholungen mittels ICP-OES und ICP-MS gemessen wurden.

Stamm	*WT*		*ctr1*	
Konstrukt	Kontrolle	*CTR1*	Kontrolle	*CTR1Δ300*
Cu [µg/g]	285 ± 15.5	465 ± 18.2	315 ± 11.3	658 ± 124.7
Fe [µg/g]	41.7 ± 1.5	35.7 ± 5.5	71 ± 2.6	143.3 ± 14.4
Zn [µg/g]	71.7 ± 0.6	60.3 ± 6.8	74 ± 3.6	190.7 ± 32.5
Mn [µg/g]	3.9 ± 0.3	4.2 ± 0.5	4.4 ± 0.03	5.2 ± 0.05
Ca [µg/g]	195 ± 7.9	221 ± 6.1	253 ± 18.0	317 ± 26.3
K [mg/g]	22.7 ± 0.04	23.6 ± 0.08	21.7 ± 0.02	17.7 ± 0.07
P [mg/g]	26.7 ± 0.02	24.2 ± 0.07	26.7 ± 0.01	26.2 ± 0.02

A 1-2-4: Transkriptom- und Promotoranalysen

Um Gene zu identifizieren, die als Antwort auf erhöhte Kupferkonzentrationen in der Hefezelle hoch reguliert werden, wurden Transkriptom- und Promotoranalysen durchgeführt. Dafür wurden die o.g. Hefelinien in drei unabhängigen Versuchsreihen über 7 Stunden in SC-leu-Flüssigmedium mit 0.02 mM $CuCl_2$ kultiviert. Aus den geernteten Zellen wurde anschließend die RNA isoliert und mittels Microarray analysiert.

Tab. 12: Anzahl an differentiell regulierten Genen mit Regulationen > 1.5[a]

Stamm	**WT**	**ρ*ctr1***
Regulation	***CTR1***	***CTR1 ρ 300***
hoch-reguliert	36	496
herunter-reguliert	42	484
Gesamt	78	980

[a] p-value < 0.05; FDR: Benjamini Hochberg

Wie Tab. 12 zeigt, resultiert die Überexpression von *CTR1* und von *CTR1Δ300* unter den o.g. Bedingungen in deutlichen Unterschieden hinsichtlich des Transkriptionsprofils. Die Überexpression von *CTR1* ergab 78 differentiell regulierte Gene nach 7 Stunden auf kupferangereichertem Medium, während fast 1000 Gene eine differenzielle Regulation bei Überexpression von *CTR1Δ300* bei gleichzeitig deutlich unterschiedlichem Elementprofil aufwiesen. Diese Ergebnisse unterstreichen die erwähnte regulatorische Rolle des C-Terminus von *CTR1* Rolle (Wu et al., 2009).

Eine detaillierte Datenanalyse aller regulierten Gene mit Annotationen zu den mittels ICP-OES und ICP-MS detektierten Elementen Kupfer und Eisen zeigt Tab. 13.
Die meisten Gene in den angeführten Kategorien sind herunter reguliert. Aus der Kategorie des Eisenregulons wurde *FMP23* (YER047W) zur Klonierung der 5'-URS ausgewählt, da in diesem Fall eine deutliche Hochregulation festgestellt wurde und auch die Transkriptmenge in einem gut detektierbaren Niveau nachgewiesen wurde.
Tab. 14 zeigt die Aufstellung aller differenziell regulierten Gene mit Annotationen zu Zink. Auch in diesem Fall sind die entsprechenden Gene überwiegend herunter reguliert.

Tab. 13. Differenziell regulierte Gene bei Überexpression von *CTR1Δ300* unter erhöhter Kupferzugabe (0.02 mM) mit Annotationen zum Kupfer- und Eisenregulon.

ORF	Gene Name	Fold change	Location of gene product	Function
Copper (up-take, distribution, binding)				
YKL220C	***FRE2***	-1.5	cell surface	Ferric/cupric reductase
YMR319C	***FET4***	-1.8	cell surface	Iron, copper, zinc transporter
YMR038C	*CCS1*	1.7	cytosol/mitochondria/nucleus	Copper chaperone for superoxide dismutase Sod1p
YDR270W	***CCC2***	-2.2	golgi	Cu(+2)-transporting P-type ATPase
Copper others: *MAC1* regulon (as listed in van Bakel *et al.*, 2005)				
YFR055W	*IRC7*	2.5	unknown	Putative cystathionine beta-lyase
YJL217W	*REE1*	1.9	cytosol	Involved in the regulation of enolase
YLR213C	*CRR1*	-1.8	ascospore wall	Putative glycoside hydrolase of the spore wall envelope
YOR389W	*YOR389W*	-1.7	unknown	Putative protein of unknown function
YPL278C	*YPL278C*	-2.5	unknown	Uncharacterized ORF
YPL277C	*YPL277C*	-2.7	membrane	Uncharacterized ORF
YLL052C	*AQY2*	-2.9	membrane	Water channel
YDL167C	*NRP1*	1.6	cytoplasm	Putative RNA binding protein of unknown function
Iron (up-take, distribution, binding)				
YOR382W	***FIT2***	-3.4	cell surface	Mannoprotein
YHL040C	***ARN1***	-2.7	cell surface	Siderophore transporter
YHL047C	***ARN2***	-2.2	cell surface	Siderophore transporter
YMR058W	***FET3***	-1.9	cell surface	Ferro-O_2-oxidoreductase
YKL220C	***FRE2***	-1.5	cell surface	Ferric/cupric reductase
YER145C	***FTR1***	-2.2	cell surface	High affinity iron permease
YMR319C	***FET4***	-1.8	cell surface	Iron, copper, zinc transporter
YOL158C	***ARN4/ENB1***	1.7	cell surface	Siderophore transporter
YIL003W	*CFD1*	2.0	cytosol	Iron-sulfur cluster binding protein
YNL240C	*NAR1*	2.1	cytosol/membrane	Iron-sulfur (FeS) protein assembly
YKR071C	*DRE2*	2.6	cytosol/mitochondria	Assembly of iron-sulfur clusters
YLR136C	***CTH2/TIS11***	-6.4	cytosol/nucleus	mRNA-binding protein
YDR270W	***CCC2***	-2.2	golgi	Cu(+2)-transporting P-type ATPase
YJL133W	*MRS3*	2.0	mitochondria	Iron transporter
YDL198C	*GGC1*	2.6	mitochondria	GTP/GDP transporter, iron transport
YOR226C	***ISU2***	3.4	mitochondria	Synthesis of iron-sulfur proteins
YPL135W	***ISU1***	2.1	mitochondria	Assembly of iron-sulfur clusters
YLL027W	*ISA1*	1.9	mitochondria	Biogenesis of the iron-sulfur (Fe/S) cluster
YLR220W	*CCC1*	1.6	vacuole membrane/golgi	Putative vacuolar Fe2+/Mn2+ transporter
YPL202C	***AFT2***	1.6	nucleus/mitochondria	Iron-regulated transcriptional activator
Iron others: *AFT1/AFT2* regulon and response to iron				
YNR056C	***BIO5***	-14.1	cell surface	Biotin biosynthesis pathway
YGR065C	***VHT1***	-3.7	cell surface	H+-biotin (vitamin H) symporter
YNR057C	*BIO4*	-8.4	cytosol	Dethiobiotin synthetase
YJR078W	***BNA2***	-5.9	cytosol	Putative tryptophan 2,3-dioxygenase
YCL026C-B	*HBN1*	-2.3	cytosol/nucleus	Uncharacterized ORF
YKR076W	***ECM4***	-1.5	cytosol	Gluthathione transferase
YBR072W	***HSP26***	-3.7	cytosol/nucleus	Small heat shock protein
YDL124W	***YDL124W***	-3.1	cytosol, nucleus, plasma membrane	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase
YER175C	***TMT1***	5.0	cytosol	Trans-aconitate methyltransferase
YBR047W	*FMP23*	4.1	mitochondria	Putative protein of unknown function
YOR271C	*FSF1*	1.8	mitochondria	Uncharacterized ORF
YOR176W	*HEM15*	-1.5	mitochondria	Ferrochelatase
YKL103C	***LAP4***	-2.3	vacuole	Aminopeptidase yscl; zinc metalloproteinase
YHL035C	***VMR1***	-1.8	vacuole membrane/mitochondria	Involved in multiple drug resistance and metal sensitivity
YJL079C	***PRY1***	-1.8	extracellular region, ER, vacuole, nuclear envelope	Protein of unknown function
YOL083W	***ATG34***	-1.7	colocalizes_with CVT complex	Receptor protein
YHR071W	***PCL5***	3.9	nucleus	Cyclin, induced by Gcn4p at level of transcription
YPL171C	***OYE3***	9.1	unknown	Conserved NADPH oxidoreductase
YBR012C	***YBR012C***	3.5	unknown	Dubious open reading frame
YPL250C	***ICY2***	1.8	unknown	Protein of unknown function

AFT1/2 targets indicated in bold. The data is compiled from Rutherford *et al.*, 2003; Rutherford and Bird 2004; van Bakel *et al.*, 2005; Kaplan and Kaplan 2009

Tab. 14. Differenziell regulierte Gene bei Überexpression von *CTR1Δ300* unter erhöhter Kupferzugabe (0,02 mM) mit Annotationen zum Zinkregulon

ORF	Gene Name	Fold change	Location of gene product	Function
Zinc (up-take, distribution, binding)				
YMR319C	*FET4*	-1.8	cell surface	Iron, copper, zinc transporter
YOL101C	*IZH4*	-2.2	membrane	Involved in zinc ion homeostasis
YKL175W	*ZRT3*	-2.2	vacuole membrane	Vacuolar membrane zinc transporter
YLR023C	*IZH3*	1.6	endoplasmic reticulum	Membrane protein involved in zinc ion homeostasis
YJL056C	*ZAP1*	-1.8	nucleus	Zinc-regulated transcription factor
Zinc others: *ZAP1* regulon				
YMR319C	*FET4*	-1.8	cell surface	Iron, copper, zinc transporter
YDR055W	*PST1*	-1.8	cell wall/plasma membrane	Cell wall protein
YBR117C	*TKL2*	-3.9	cytoplasm/nucleus	Transketolase
YNL254C	*RTC4*	-1.6	cytoplasm/nucleus	Protein of unknown function
YKL175W	*ZRT3*	-2.2	vacuole membrane	Vacuolar membrane zinc transporte
YDR284C	*DPP1*	-1.6	vacuole membrane	Lipid phosphatase
YPL154C	*PEP4*	-1.6	vaculole lumen/mitochondria	Vacuolar aspartyl protease
YOL084W	*PHM7*	-2.6	vacuole	Protein of unknown function
YJL132W	*YJL132W*	-1.8	membrane	Putative protein of unknown function
YKL165C	*MCD4*	-1.9	ER/cell wall/vacuole	Involved in glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor synthesis
YKL174C	*TPO5*	1.6	golgi	Involved in excretion of putrescine and spermidine
YJL056C	*ZAP1*	-1.8	nucleus	Zinc-regulated transcription factor
YGL121C	*GPG1*	-2.3	unknown	Proposed gamma subunit of the heterotrimeric G protein
YJR061W	*YJR061W*	-2.4	unknown	Putative protein of unknown function
YPL250C	*ICY2*	1.8	unknown	Protein of unknown function

The data is compiled from Lyons *et al.* , 2000

A 1-2-5: Klonierung von spezifisch regulierten Promotoren, Vektorherstellung

Promotoren (im Folgenden sind die 1000 bp 5‘-seitig des jeweiligen Leserahmens der Gene als Promotoren bezeichnet), die durch erhöhte Kupferkonzentrationen in der Hefezelle induziert werden und mittels Microarray-Analysen identifiziert wurden, sollten für eine induzierte Expression von Hefeoberflächenproteinen kloniert werden. Zunächst wurden die Gene *CUP1-1* und *SOD1* ausgewählt, deren Transkription durch hohe Kupferkonzentrationen hoch reguliert ist, um der toxischen Wirkung von Kupferionen in der Zelle entgegen zu wirken (Gross *et al.*, 2000; Yasokawa *et al*., 2008). Mittels PCR wurden die Promotoren amplifiziert und vor die Leserahmen von Aga2Minus bzw. Aga2cMycMinus kloniert. Beide letztgenannten Leserahmen kodieren für Oberflächenproteine der Hefe, die mit einem starken negativen Ladungscluster versehen wurden. Weiterhin wurden für die Generierung von Biosensoren die Gene *YML116* (*ATR1*), *YBR047W* (*FMP23*) und *YOR387C* ausgewählt, basierend auf ihrer differenziellen Regulation in Antwort auf höhere Kupferwerte. Die Promotoren dieser Gene wurden ebenfalls vor die Leserahmen von Aga2cMycMinus kloniert und zusätzlich vor den ORF des Reporterproteins TurboRFP.

A 1-3: Sensoren für die Produktion eines rekombinanten Proteins am Beispiel des Hydrophobins Hfb1 aus *Trichoderma reesei*

Die rekombinante Produktion eines Zielproteins soll durch Expression eines Fusionsproteins aus dem Zielprotein (Hfb1) und EGFP als Marker untersucht werden. Das Markerprotein soll vom Zielprotein mittels Einsatz einer spezifischen Protease (TEV) abspaltbar sein.

A1-3-1: Herstellung eines Hydrophobin-Polyprotein-EGFP Konstruktes mit integrierter Proteaseschnittstelle

Der Grundaufbau eines solchen Poly-Hydrophobins ist in Abb. 15 dargestellt. Hierbei ist das erste Hydrophobin durch eine TEV-Protease Schnittstelle von dem zweiten Hydrophobin getrennt und dieses wiederum durch eine weitere TEV-Protease Schnittstelle von dem Reporterprotein EGFP. In Abb. 16 ist der detaillierte Aufbau der Konstrukte dargestellt, die am IfG hergestellt wurden.

Abb. 15: Schematische Darstellung des Poly- Hydrophobin Konstruktes (Einzelheiten siehe Text).

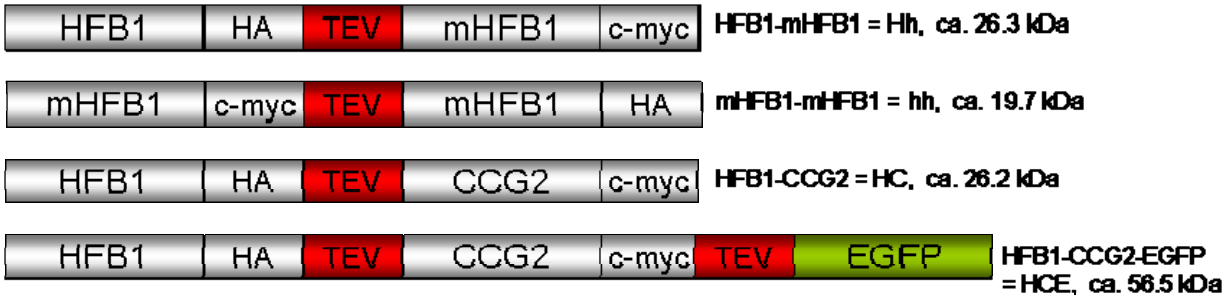


Abb. 16: Schematischer Aufbau der Hydrophobine, die in der Hefe *Pichia pastoris* hergestellt werden sollten (Einzelheiten siehe Text).

Es wurden drei verschiedene Poly-Hydrophobin-Konstrukte für die Expression in der Hefe *Pichia pastoris* generiert, die sich in ihren einzelnen Hydrophobinkomponenten unterscheiden. HFB1-mHFB1 und mHFB1-mHFB1 setzen sich aus dem HFB1 Hydrophobin aus *Trichoderma reesei* zusammen und unterscheiden sich nur durch die Reihenfolge der tags (HA und c-myc) für die Detektion im Western Blot, sowie durch den Erhalt des natürlichen Signalpeptides des HFB1 im Fall des Konstruktes HFB1-mHFB1. Das dritte Hydrophobin HFB1-CCG2, setzt sich aus dem Hydrophobin HFB1 aus *Trichoderma reesei* und dem Hydrophobin CCG2 aus *Neurospora crassa* zusammen. Hierbei handelt es sich um die Fusion eines Klasse II Hydrophobins (HFB1) mit einem Klasse I Hydrophobin (CCG2). Des Weiteren wurden Leserahmen für ein HFB1-EGFP Fusionsprotein und ein HFB1-CCG2-

EGFP Fusionsprotein erzeugt, um die Bildung der Proteine während es Fermentationsverlaufs nearline mittels Flowcytometer vermessen und die daraus gewonnenen Daten auf Kultivierungen des Poly-Hydrophobins übertragen zu können. Als Vergleich wurden auch Leserahmen für das monomere Hydrophobin (Konstrukt HFB1) zur Expression in *Pichia pastoris* und das nichtoberfälchenaktive EGFP kloniert.

A1-3-2 Herstellung rekombinanter Hefen, die das Hydrophobin-Polyprotein-EGFP-Konstrukt exprimieren und sezernieren

Die in Abb. 16 dargestellten Konstrukte konnten in der Hefe *Pichia pastoris* genomisch integriert werden. Der Nachweis der Expression der Proteine erfolgte mittels SDS Gelelektrophorese und anschließender immunologischer Detektion im Western Blot (Abb. 17) mittels des c-myc tag, der in allen Konstrukten enthalten ist.

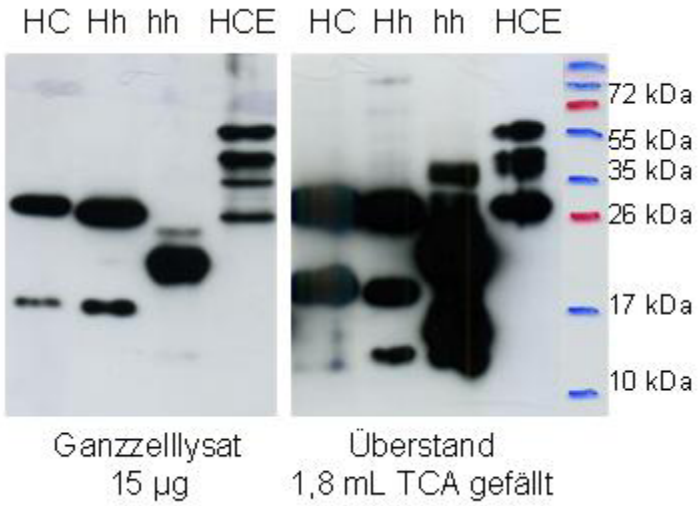


Abb. 17: Western Blot zum Nachweis der Expression der Zielproteine
Nachweis der Proteine im Lysat der Zellen (20 µg Gesamtprotein), Detektion des c-myc-tag.

Der in Abb. 17 dargestellte Blot zeigt Banden für alle zu exprimierenden Proteine in den erwarteten Größen. Die Proteine konnten sowohl in den Zellen als auch im Kulturüberstand detektiert werden. Das Fusionsprotein HFB1-CCG2-EGFP ist jedoch sehr instabil, es sind zahlreiche Abbaubanden zu erkennen.

Der Meilenstein 2 „Expression eines Hydrophobin-Polyproteins in Hefe“ wurde fristgerecht erreicht.

Das fusionierte EGFP soll im Überstand während der Kultivierung detektiert werden und somit Aufschluss über den Produktbildungsverlauf und den optimalen Erntezeitpunkt geben. Um die Fluoreszenzintensität des EGFPs zu messen, wurde das Fusionsprotein HCE im Pichia Expressionssystem hergestellt. Als Vergleich wurden die drei Poly-Hydrophobin

Stämme ohne EGFP Tag gleichzeitig kultiviert und vermessen. Nach Kultivierung wurden die Suspensionskulturen und die Überstände im Mikrotiterplatten Fluoreszenzmesssystem Fluostar vermessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt. Die höchste Fluoreszenz liegt im Fall des HCE Stammes mit fusioniertem EGFP bei der Vermessung der gesamten Suspensionskultur vor. Jedoch liegen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in einem sehr niedrigen Level im Bereich der Eigenfluoreszenz der Zellen. Im Überstand konnte nur im Fall des HCE-Stammes die höchste Fluoreszenz nicht erreicht werden. Diese Daten verdeutlichen die bereits im Western Blot beobachtete Instabilität des HCE Konstruktes. Somit ist ein Fluoreszenzanstieg während der Kultivierung wahrscheinlich nur sehr schwer detektierbar.

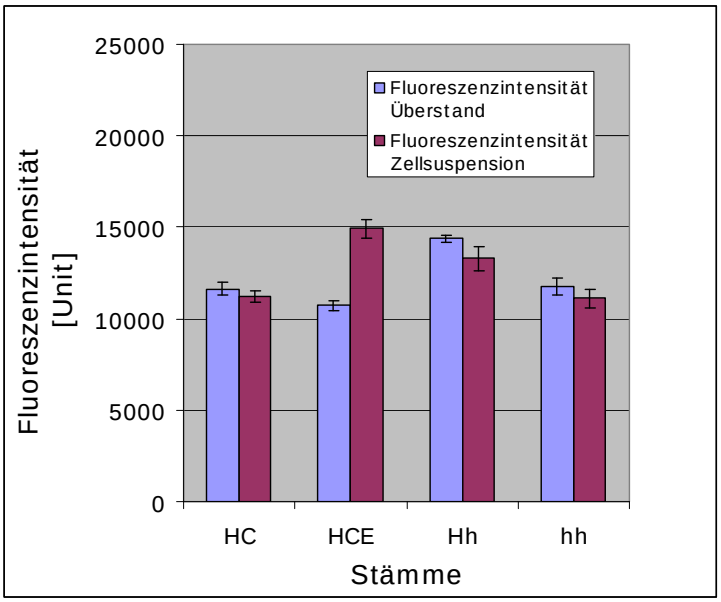


Abb. 18: Fluoreszenzmessungen mit Kulturen Poly-Hydrophobin exprimierender Stämme. Vermessen wurde bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm die gesamte Zellsuspension sowie der Überstand nach Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation.

Die entwickelten Stämme wurden planungsgemäß dem ILBT zu weiteren Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

A1-4: Sensoren mit heterologen Rezeptoren am Beispiel des Quorum sensing

Es soll die Basis zur Erweiterung des Einsatzes von Hefen in der Sensorik gelegt werden, indem heterologe Rezeptoren mit der Hefe-eigenen Pheromon-Signalkaskade gekoppelt werden.

A1-4-1: Herstellung und Charakterisierung von LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionsgenen

Es wurden zunächst auf DNA-Ebene zwei Konstrukte erstellt, die für Fusionsproteine kodieren, bei denen LuxP bzw. Δ23LuxP (Deletion der Signalsequenz) zwischen den Aminosäuren 114 und 115 von Ste2p inseriert vorliegen. Ste2p ist der Rezeptor für das Hefepheromon **α**-Faktor. Die Konstrukte tragen die Arbeitsbezeichnung Stelux1 und Stelux2 und sind in Abb. 19 schematisch gezeigt.

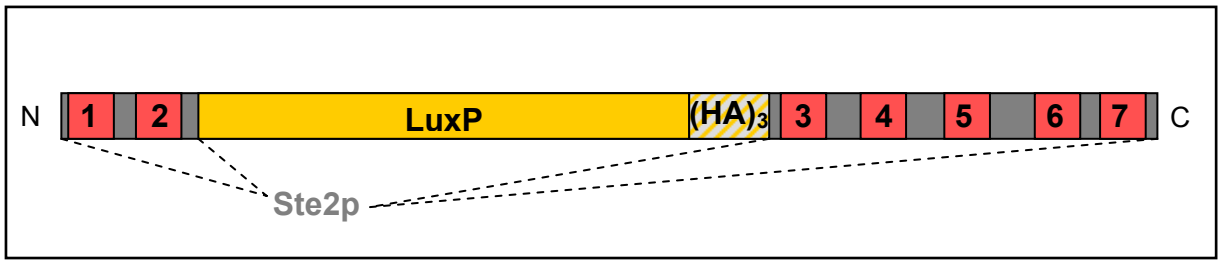


Abb. 19: Schematische Darstellung der Ste2p-LuxP-Fusionsproteine
grau: Ste2p; gelb: LuxP mit 3 fachem, c-terminalen HA-Tag; rot: Transmembrandomänen von Ste2p. LuxP wurde zwischen die Aminosäuren 114 und 115 und somit zwischen die Transmembrandomänen 2 und 3 des α-Faktor Rezeptors (Ste2p) inseriert.

Nach Klonierung der LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionsgene in geeignete Hefeexpressions-vektoren für die Plasmid-basierte Expression sowie für die genomische Integration erfolgte die Expression in verschiedenen *S. cerevisiae* BY4741-Stämmen.

Die Expression der Plasmid-basierten Konstrukte konnte auf Grund der Verwendung verschieden starker Promotoren reguliert werden. Die Analyse der Expression der LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionsproteine erfolgte mittels Western Blot und immunologischer Detektion des HA-Tags (Abb. 20). Die Unterschiede in der Expressionsstärke spiegeln sich in der Anzahl und Intensität der erhaltenen Signale wieder, wobei sich keine erkennbaren Unterschiede in der Expression der beiden verschiedenen LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionsproteinvarianten Stelux1 und Stelux2 zeigen. Erkennbar sind zahlreiche Banden die sich deutlich unterhalb der zu erwartenden Größe von 94,8 kDA (Stelux1) und 92,4 kDA (Stelux2) befinden, was auf eine Degradation der Proteine hindeutet. Nur bei stärkster Expression erscheinen Signale im erwarteten Größenbereich. Die Expression der genomisch integrierten Konstrukte war mittels Western Blot nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

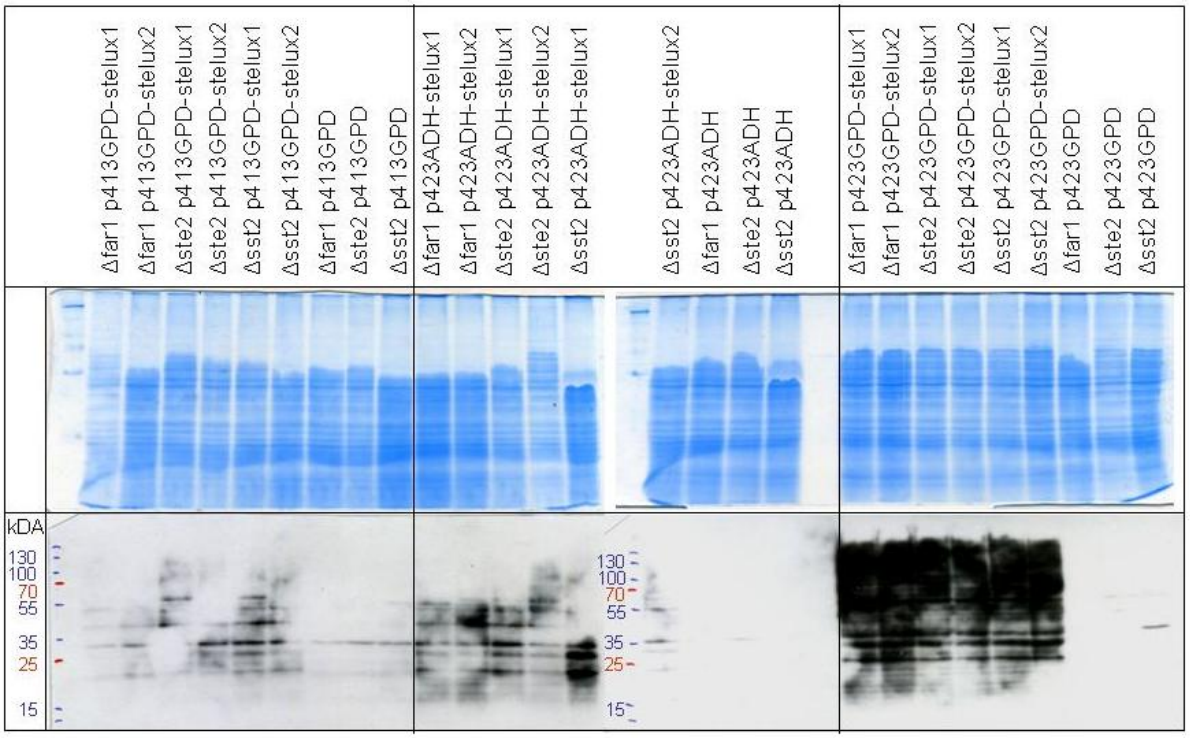


Abb.20: Untersuchung der Expression der Fusionsproteine mittels Western-Blot.

Immunologische Detektion der LuxP-α-Faktor Rezeptor-Fusionsproteine Stelux1 und Stelux2. Für eine niedrige Expressionsrate erfolgte die Expression der LuxP-α-Faktor Rezeptor-Fusionsgene von den *single copy*-Plasmiden p413GPD-stelux1/2 mit dem relativ starken konstitutiven *GPD1*-Promotor. Eine mittlere und starke Expressionsrate wurde durch die Expression von *multi copy*-Plasmiden mit dem moderaten *ADH1*-Promotor bzw. dem *GPD1*-Promotor erzielt (p423ADH-stelux1/2 bzw. p423GPD-stelux1/2). Ganzzellrohextrakte der BY4741-Stämme *Δfar1*, *Δste2* und *Δsst2* wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot immunologisch mit einem *mouse* anti-HA-Antikörper und einem sekundären HRP-gekoppeltem Antikörper detektiert. Zahlreiche Banden, die sich deutlich unterhalb der zu erwartenden Größe von 94,8 kDA (Stelux1) und 92,4 kDA (Stelux2) befinden, deuten auf eine Degradation der Proteine hin. Nur bei stärkster Expression (p423GPD-stelux1/2) erscheinen Signale im erwarteten Größenbereich.

Zur Aufklärung der korrekten Lokalisation der LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionsproteine in der Zellmembran wurde eine Immunofluoreszenzfärbung mit einem *mouse* anti-HA-Antikörper und einem sekundären Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper (anti-mouse-Alexafluor 488) durchgeführt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 21). Nur vereinzelte Zellen fluoreszieren. Gegenüber der Kontrolle (leerer Vektor) ist bei den Zellen mit dem LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionskonstrukt Stelux1 ein deutlicheres Fluoreszenz-signal zu beobachten, nicht aber bei den Zellen mit dem Fusionskonstrukt Stelux2.

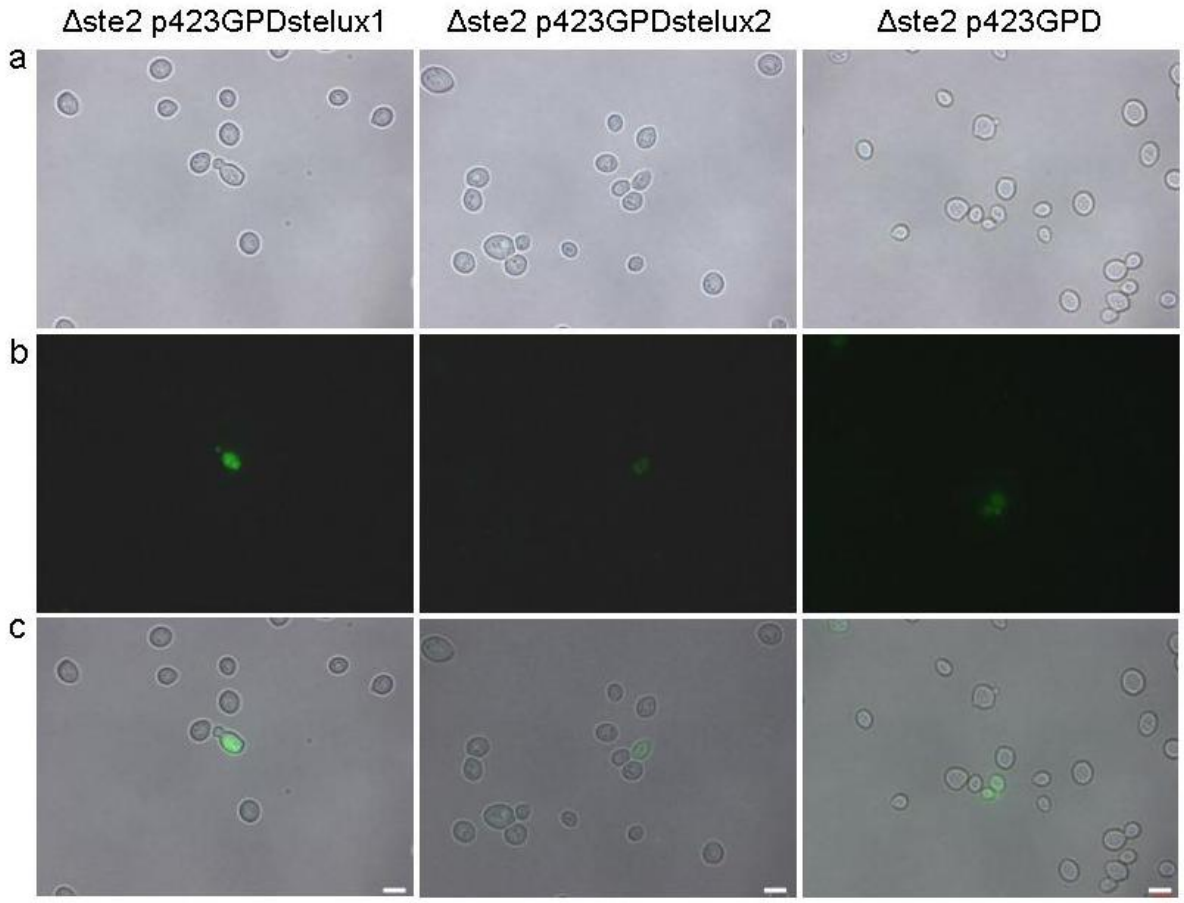


Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Expression der Fusionsproteine in Hefe
Immunofluoreszenzfärbung: Lebende Zellen mit dem LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionskonstrukt Stelux1 oder Stelux2 bzw. mit leerem Vektor (Kontrolle) wurden mit einem *mouse* anti-HA-Antikörper und einem sekundären Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper (anti-mouse-Alexafluor 488) inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. a) lichtmikroskopisches Bild; b) Fluoreszenzbild; c) *overlay* von a und b; Maßstabsbalken entspricht 5 µm.

Da die Expression der zusammenhängenden (kontinuierlichen) und dadurch relativ großen LuxP-α-Faktor-Rezeptor Fusionsgene noch nicht zufriedenstellend funktionierte, wurde ein alternativer Ansatz verfolgt. Die diskontinuierliche Expression eines funktionellen α-Faktor-Rezeptors in Hefe konnte von Martin et al. (1999) gezeigt werden. Analog wurden die LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionsgene so in je zwei Hefevektoren kloniert, dass ein N-terminaler Teil des LuxP-α-Faktor-Rezeptors, bestehend aus den Aminosäuren 1 bis 114 des α-Faktor-Rezeptors und LuxP mit dem 3-fachen HA-Tag, von einem Plasmid und der entsprechende C-terminale Teil (SteluxC), Aminosäuren 115 bis 431 mit dem FLAG-TAG, von einem weiteren Plasmid codert wird (Abb. 22). Analog zu den zusammenhängenden LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionskonstrukten wurde LuxP sowohl in voller Länge (Stelux1N) als auch um die Signalsequenz verkürzt (Stelux1N) kloniert.

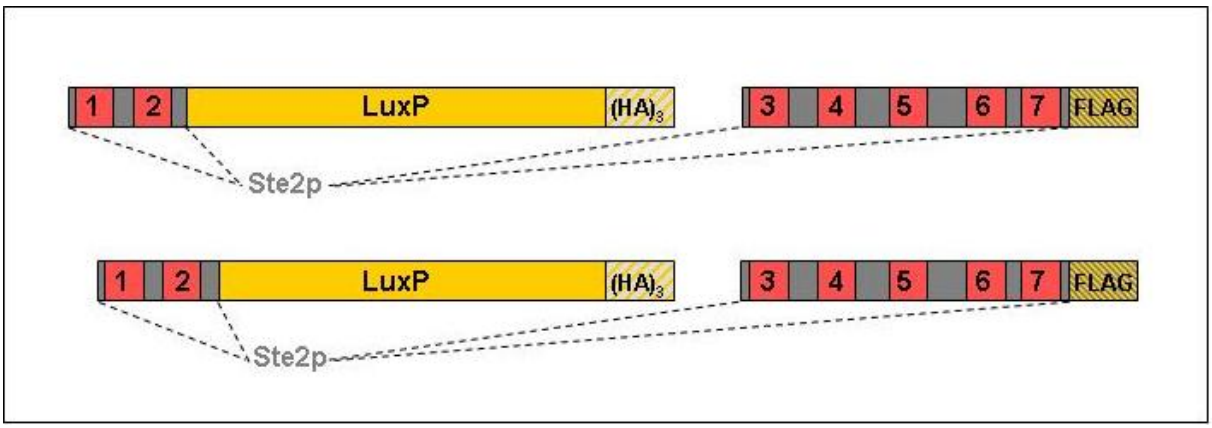


Abb. 22: Schematische Darstellung der diskontinuierlich exprimierten Ste2p-LuxP-Fusionsproteine
grau: Ste2p; gelb: LuxP in voller Länge (oben) und verkürzt (unten) mit 3 fachem, c-terminalen HA-Tag; rot: Transmembrandomänen von Ste2p. Einzelheiten siehe Text.

Beide Plasmide wurden zunächst einzeln und anschließend auch gleichzeitig in Hefe transformiert. Die Analyse der Expression der LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionsproteine erfolgte mittels Western Blot und immunologischer Detektion des HA-Tags bzw. FLAG-Tags (Abb. 23). Dabei war festzustellen, dass nach Wachstum der Zellen bei der Standardkultivierungstemperatur von 30 °C der jeweils N-terminale Teil der LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionsproteine (Stelux1N und Stelux2N) nicht in der zu erwartenden Größe, sondern deutlich kleiner vorlag. Teilweise waren auch mehrere kleinere Banden erkennbar (ohne Abbildung), sodass wiederum von einer Degradation der Proteine ausgegangen werden muss. Der C-terminale Teil der LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionsproteine (SteluxC) lag in zu erwartender Größe vor.

Eine Reduktion der Kultivierungstemperatur auf 25 °C bewirkte eine deutliche Verbesserung in der Expression von Stelux1N und Stelux2N (Abb. 24). Der Großteil der Proteine lag nun in der erwarteten Größe vor, nur noch ein Teil unterlag einer Degradation.

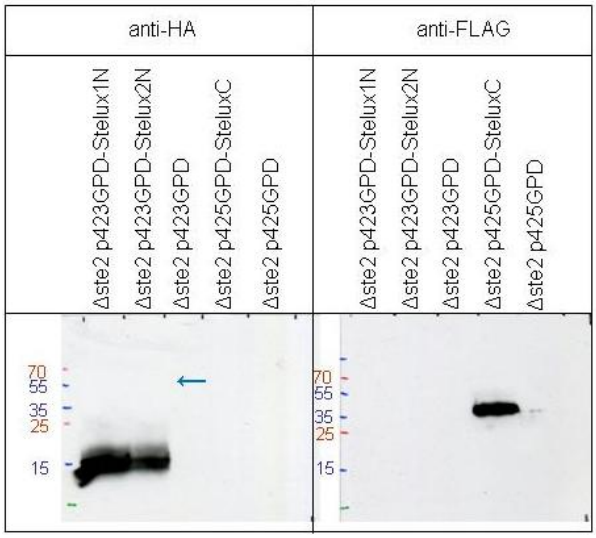


Abb.23: Western Blot, immunologische Detektion der diskontinuierlich exprimierten LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionskonstrukte Stelux1-HA, Stelux2-HA und SteluxC-FLAG nach Kultivierung bei 30 °C. SteluxC-FLAG wird in erwarteter Größe von ca. 36 kDa gebildet. Die Signale von Stelux1-HA und Stelux2-HA erscheinen deutlich unter der erwarteten Größe von ca. 58-59 kDa (blauer Pfeil).

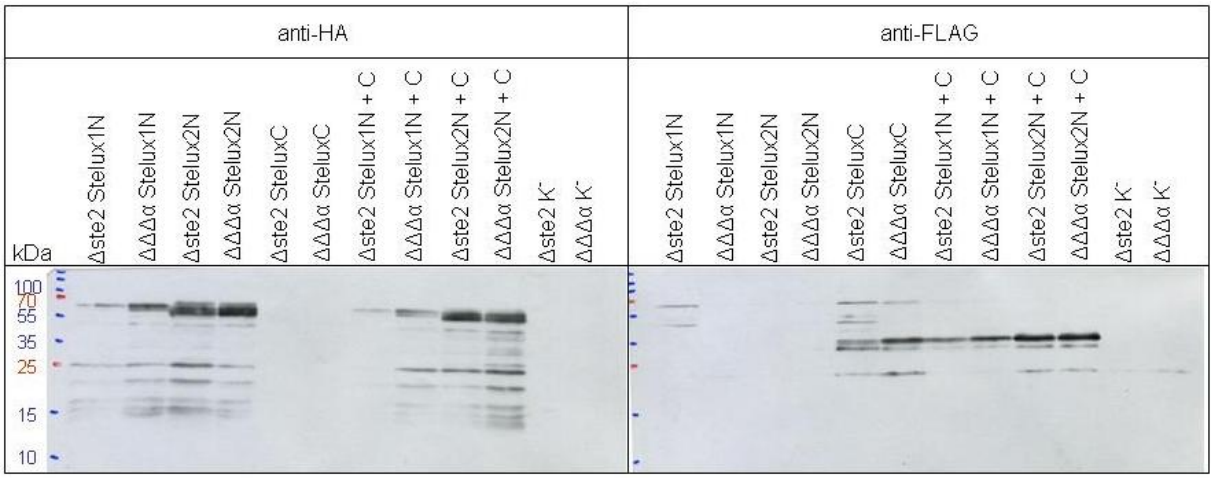


Abb.24: Western Blot, immunologische Detektion der diskontinuierlich exprimierten LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionskonstrukte Stelux1-HA, Stelux2-HA und SteluxC-FLAG nach Kultivierung bei 25 °C. Alle drei Proteine werden in erwarteter Größe von ca. 59 kDa, 58 kDa bzw. 36 kDa gebildet. Kleinere Banden deuten auf partielle Degradation hin.

A1-4-2: Herstellung eines Reportergenplasmides für Hefe

Es wurden Reportergenplasmide hergestellt, welche das Gen für die bakterielle β-Galaktosidase bzw. das Gen für das rot fluoreszierende Protein turboRFP unter der Kontrolle des Pheromon-induzerbaren *FIG1*-Promotors enthalten. Das rote Fluoreszenzsignal ist an lebenden Zellen online detektierbar und ermöglicht damit fortlaufende Messungen über bestimmte Zeiträume hinweg sowie einen höheren Probendurchsatz. Beide Reportergenplasmide wurden durch Sequenzanalyse überprüft.

A1-4-3 Herstellung rekombinanter Hefen zur Untersuchung der Genbanken

Durch Insertion von Markergenen in die Leserahmen der beiden Gene *MFα1* und *MFα2*, die für das Hefepheromon α-Faktor codieren, wurde ein Doppeldeletionsstamm des Paarungstyps α erzeugt. Ein α-Faktor-Rezeptor-Deletionsstamm (*Δste2*) des Paarungstyps a wurde kommerziell (Euroscarf, Frankfurt) erworben. Eine Kreuzung dieser beiden Stämme gelang durch Kompensation der α-Faktor-Rezeptor-Deletion durch Expression des entsprechenden Gens von einem eigens dafür konstruierten Plasmid sowie externer Zugabe von synthetischem α-Faktor-Pheromon. Die erfolgreiche Deletion aller drei Gene sowie die Bestimmung des Paarungstyps der aus der Kreuzung hervorgegangenen haploiden Zellen erfolgten mittels PCR und Restriktionsverdau der erhaltenen Fragmente (Abb. 25 und 26). Die eindeutigen positiven Ergebnisse erübrigen eine weitere aufwendige Analyse mittels

Southern Blot-Hybridisierung. Der erzeugte Stamm *Δmfα1*, *Δmfα2*, *Δste2* 8A wurde weiterverwendet und wird im Folgenden als Dreifachdeletionsstamm ΔΔΔα bezeichnet.

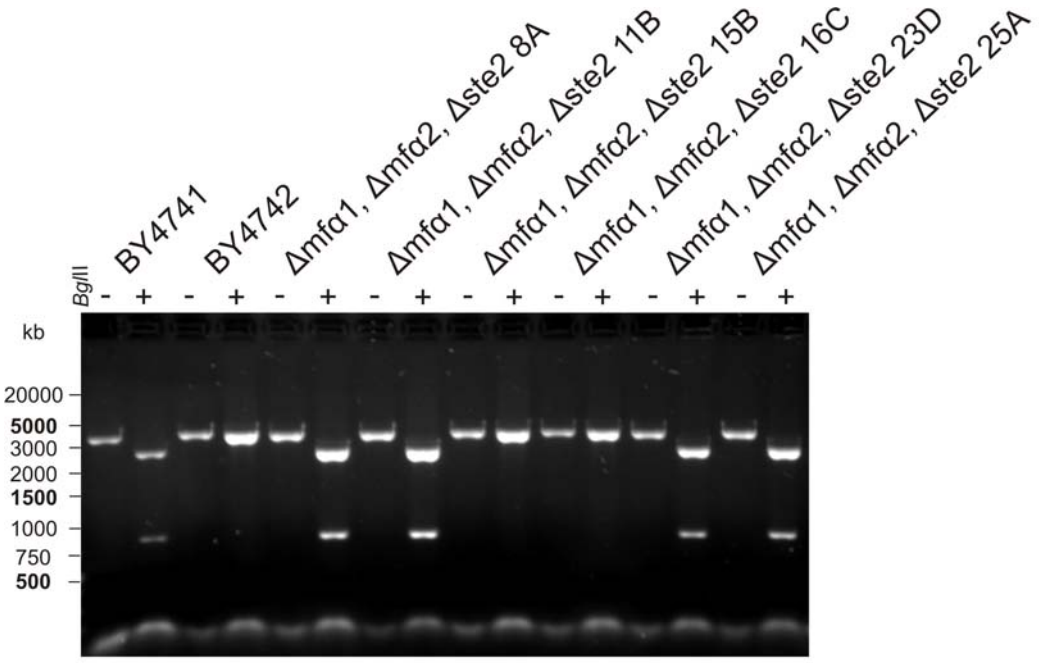


Abb.25: PCR-Amplifikation und Testrestriktion der MAT-Regionen zur Bestimmung des Paarungstyps: Das Restriktionsenzym *Bgl*II schneidet im Paarungstyp a (BY4741), nicht jedoch im Paarungstyp α (BY4742).

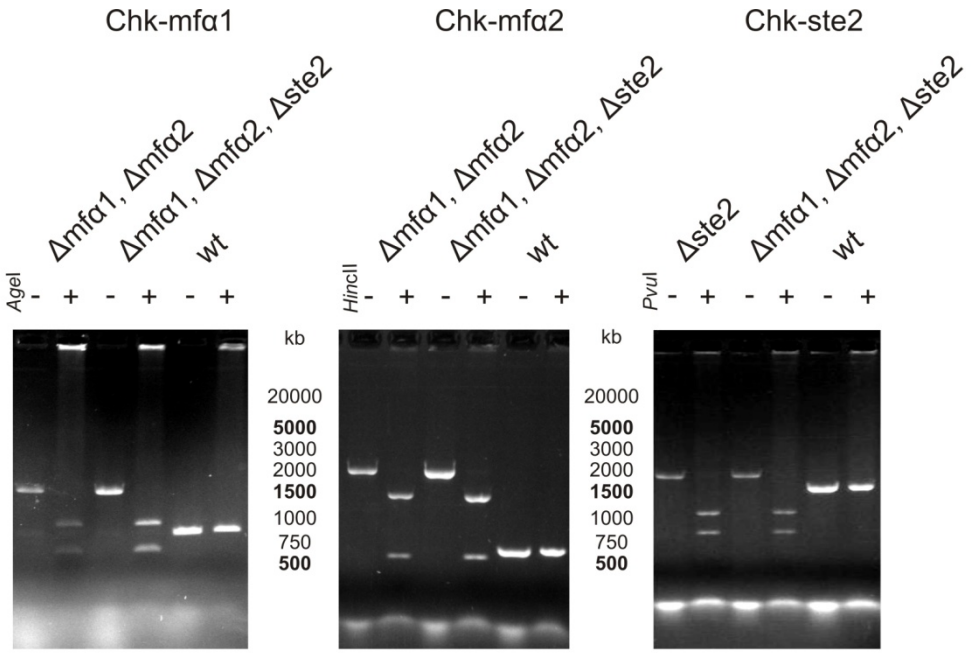


Abb.26: PCR-Amplifikation und Testrestriktion der entsprechenden Genorte von *MFα1*, *MFα2* und *STE2* in den erzeugten Deletionsstämmen sowie im Wildtypstamm. Durch Verdau mit den angegebenen Restriktionsenzymen konnte die Insertion der Deletionskassette bestätigt werden.

A1-4-4: Funktionsanalysen der rekombinanten Hefen

Das zu detektierende Quorum sensing-Molekül Autoinducer-2 (AI-2) ist kommerziell nicht erhältlich, Stattdessen wurde der Kulturüberstand einer lumineszierenden *Vibrio harveyi*-Übernachtkultur verwendet. Die erzeugten Hefen wurden in dem durch Zentrifugation und Sterilfiltration zellfreien und mit Nährstoffen angereicherten *V. harveyi*-Kulturüberstand inkubiert. Als Kontrollen wurde α-Faktor und Wasser eingesetzt. Über einen Zeitraum von 24 bis 48 Stunden erfolgte die Messung der Induktion eines Reportergens. TurboRFP wird schnell gebildet und kann ohne die Zerstörung der Zellen kontinuierlich fluorimetrisch gemessen werden. Die ursprünglich geplante Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität erwies sich als deutlich aufwändiger und insensitiver.

Leider war mit keinem der LuxP-α-Faktor-Rezeptor-Fusionskonstrukte eine Induktion detektierbar. Allerdings war eine bei den verschiedenen Konstrukten unterschiedlich stark ausgeprägte Induktion mit synthetischem α-Faktor-Pheromon nachweisbar (Abb. 27, 28 und 29). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Hybridproteine gebildet und funktionell in die Zellmembran inseriert werden. Erstaunlicherweise zeigten die Hefen mit genomisch integriertem Stelux-Konstrukt die stärkste Induzierbarkeit mit α-Faktor, obwohl die Expression der Konstrukte im Western Blot nicht nachweisbar war.

Die mit der Aktivierung der Pheromonsignalkaskade einhergehende morphologische Veränderung der Hefezellen war ebenfalls nachweisbar. Auch hier zeigte sich die deutlichste Ausprägung bei den genomisch integrierten Stelux-Konstrukten (Abb. 30).

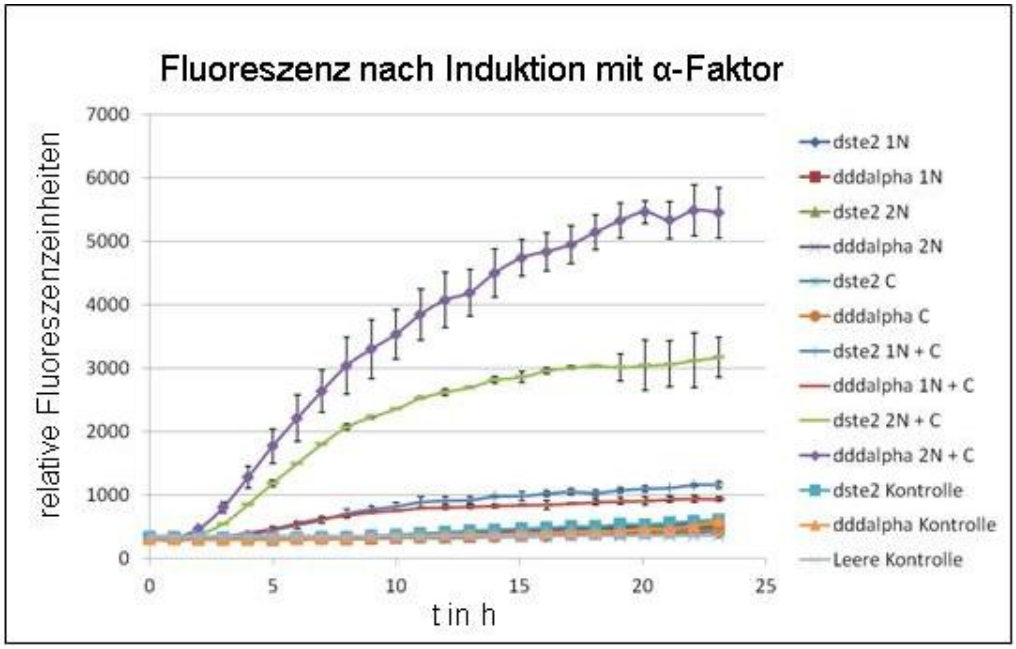


Abb. 27: Online-Fluoreszenzmessung der rekombinanten Hefen mit diskontinuierlich exprimierten Stelux-Konstrukten nach Induktion mit synthetischem α-Faktor-Pheromon. dste2 = α-Faktor-Rezeptor-Deletionsstamm (Δste2); dddalpha = Dreifachdeletionsstamm ΔΔΔα (Einzelheiten siehe Text)

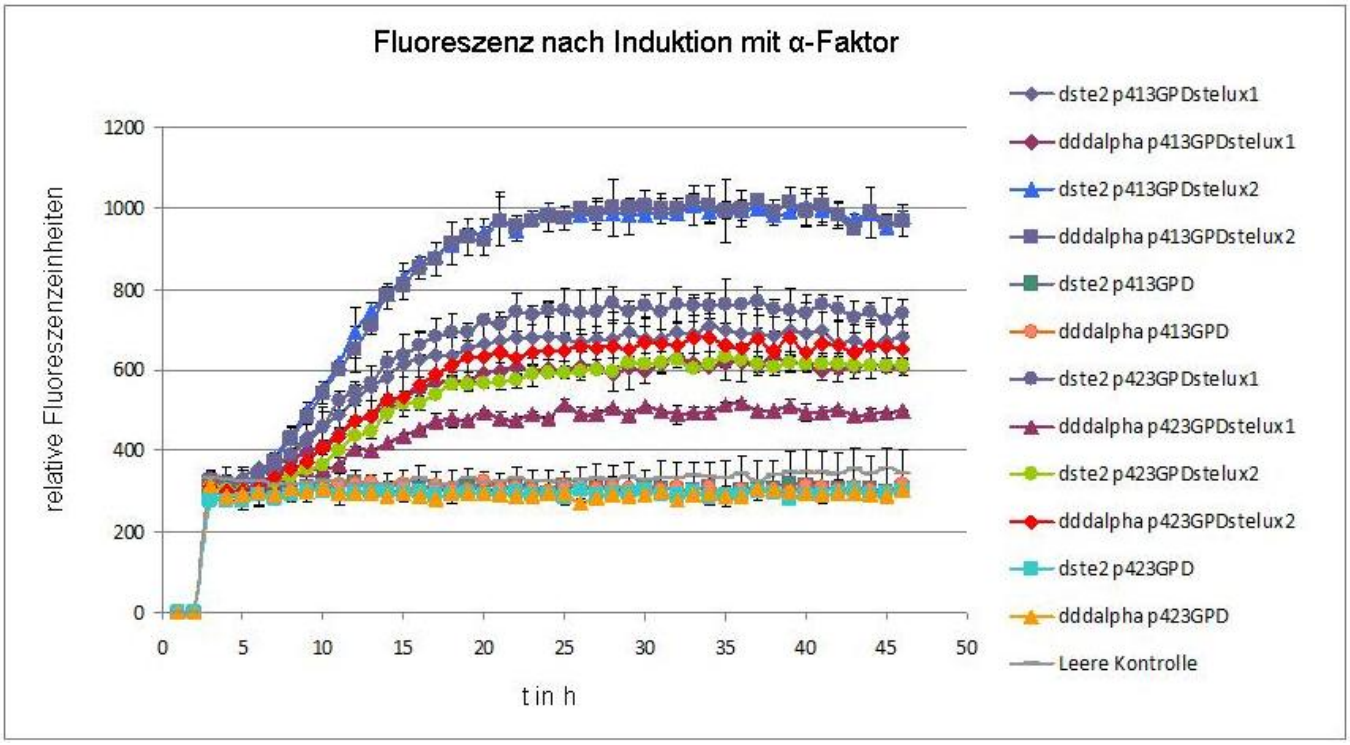


Abb. 28: Online-Fluoreszenzmessung der rekombinanten Hefen mit kontinuierlich exprimierten Stelux-Konstrukten in unterschiedlicher Kopienzahl nach Induktion mit synthetischem α-Faktor-Pheromon. dste2 = α-Faktor-Rezeptor-Deletionsstamm (Δste2); dddalpha = Dreifachdeletionsstamm ΔΔΔα; p413GPD = *single copy*-Vektor; p423GPD = *multi copy*-Vektor (Einzelheiten siehe Text)

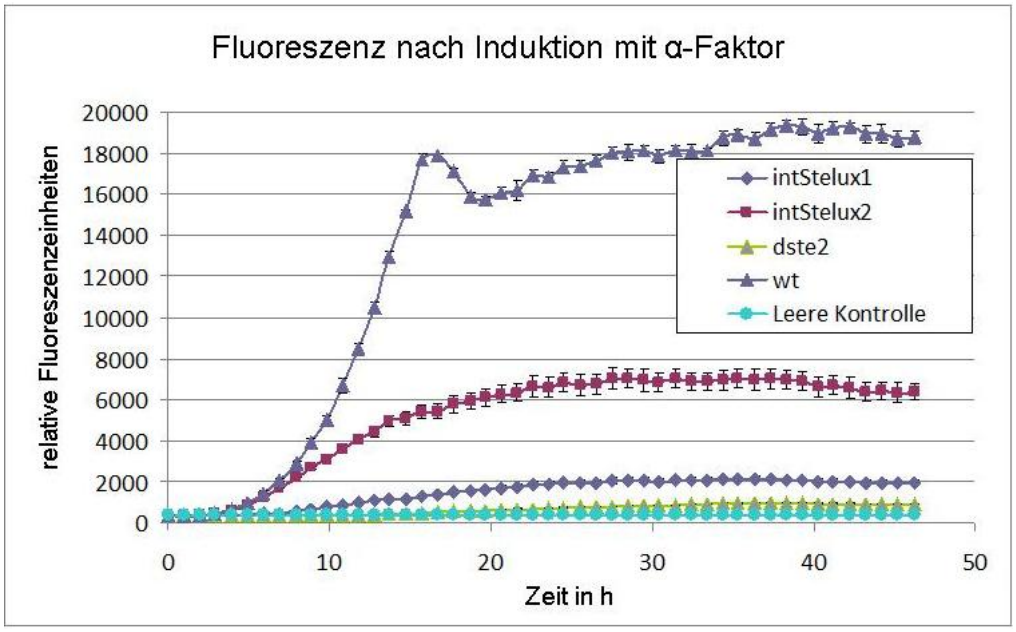


Abb. 29: Online-Fluoreszenzmessung der rekombinanten Hefen mit genomisch integrierten Stelux-Konstrukten nach Induktion mit synthetischem α-Faktor-Pheromon. (Einzelheiten siehe Text)

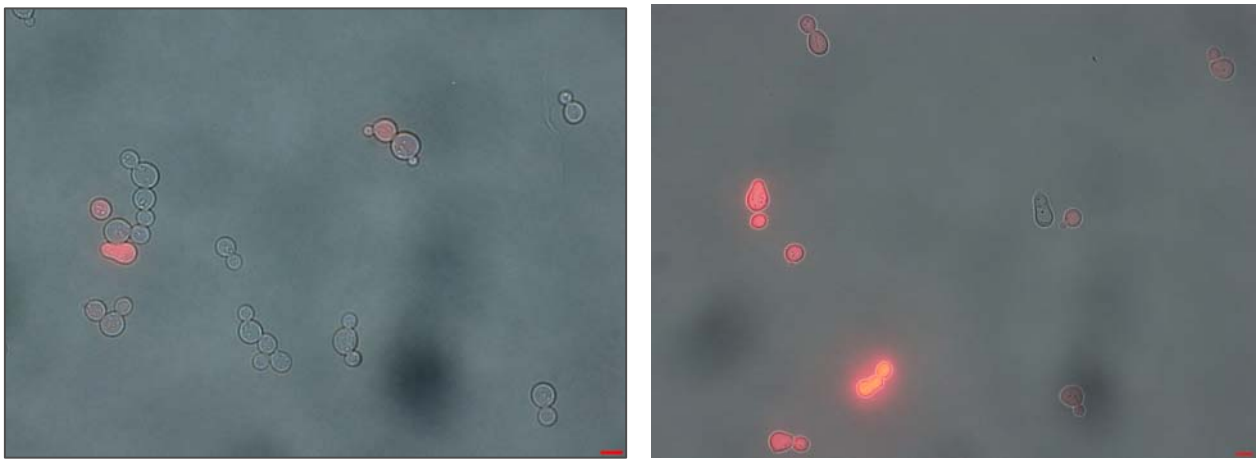


Abb. 30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Overlay aus Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme) der rekombinanten Hefen mit genomisch integrierten Stelux-Konstrukt 1 (links) und -2 (rechts). Maßstabsbalken entspricht 5 µm. (Einzelheiten siehe Text)

A2: Modul „Schalter“ (A2)

A2-1: Bildung von GFP

Die durch fluoreszierende Proteine erzeugte Fluoreszenz soll beim Einsatz von technischen Schaltern als primäres Signal des Schaltprozesses genutzt werden. Dazu wird der Leserahmen des entsprechenden Proteins unter die Kontrolle eines im Modul „Sensor“ identifizierten Promotors gestellt. Beispiele für die erfolgreiche Generierung diese Sensorhefen sind unter „A1-1-2: Klonierung von spezifisch regulierten Promotoren, Vektorherstellung“ zu finden.

A2-2: Bildung und Sekretion von Pheromonen

Eine durch chemische Schad- und Arzneistoffe induzierbare Freisetzung von α-Faktor soll als Schalter bzw. als Verstärkungssignal eingesetzt werden. Wie im Modul „Sensor“ dargestellt, wurde eine stabile Induktion der 5’ URS von *PDR5* durch Diclofenac ausgelöst und diese über fluoreszente Reporterproteine nachgewiesen. Der ORF des α-Faktors wurde nun hinter die 5’ URS von *PDR5* kloniert und die Expression getestet (Daten nicht gezeigt). **Der Meilenstein M4 „Bildung und Sekretion von Pheromonen“ wurde fristgerecht erreicht**.

A2-3: Bildung und Sekretion von Enzymen

Ziel war es, durch ein Signal aus der Umgebung, zum Beispiel einen Schadstoff, eine Expression sowie Sekretion von Enzymen hervorzurufen, die z.B. Hüllstrukturen abbauen können. Als Hüllstrukturen wurden die Biopolymere Chitosan und Cellulose gewählt. Kloniert wurden die Leserahmen für die Chitosanase aus *Streptomyces sp.* Strain N174 sowie die Endoglucanasen III und V aus *Trichoderma reesei* und die Endoglucanase I aus *Trichoderma viride.* Die Leserahmen der Chitosanase und der Endoglucanase I wurden synthetisch hergestellt. Während der Klonierung dieser Gene wurden die nativen Signalsequenzen durch das Signalpeptid des α-Faktors ersetzt, um eine Sekretion aus der Hefezelle zu gewährleisten. Die Fusionsgene wurden in das Shuttle-Plasmid p426GPD kloniert, in *E. coli* vervielfältigt und in *S. cerevisiae* BY4741 transformiert. Um eine erfolgreiche Expression und Sekretion der Proteine zu untersuchen, erfolgten Aktivitätstests. In Zusammenarbeit mit dem IfWW konnte die Expression sowie Sekretion der Chitosanase nachgewiesen werden, die Chitosanhüllen abbaut. Der Aktivitätstest für die Endoglucanasen erfolgte durch Kongorotfärbung. Dafür wurden Agarplatten, die 0,5 % Carboxymethylcellulose (CMC) enthielten, verwendet. Aus den Platten wurden Löcher ausgestanzt, in die anschließend die Proben pipettiert wurden. Nach einer dreitägigen Inkubation bei 30°C wurden die Platten mit einer 5 %igen Kongorotlösung gefärbt und anschließend mit 1 M NaCl zum Entfärben gewaschen. Das Prinzip beruht auf dem Anfärben der Cellulose in den

Agarplatten durch Kongorot. Dort, wo Cellulasen aktiv sind und die Cellulose abgebaut wird, entstehen helle Höfe.

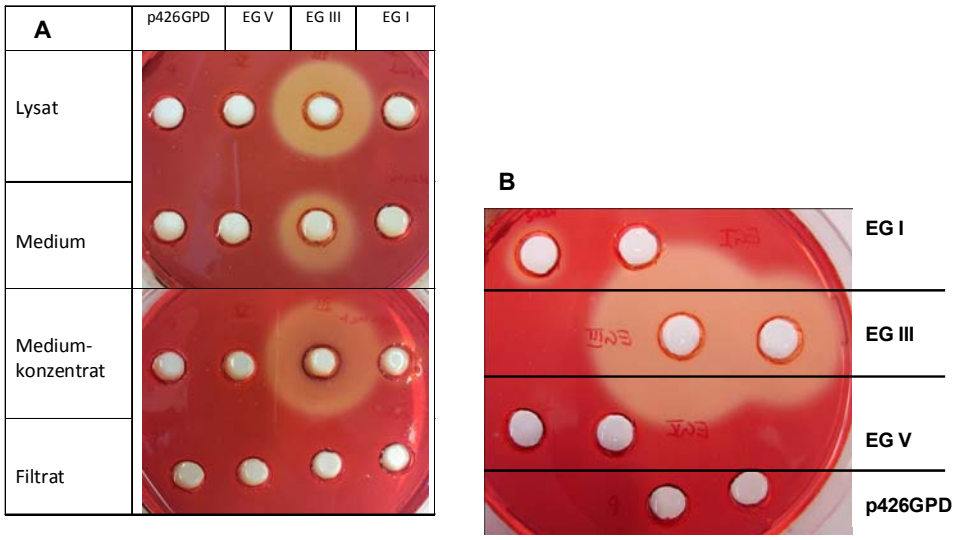


Abb. 31: Celluloseabbau durch in *S. cerevisiae* gebildete und sekretierte Endoglucanase III. A) Vergleich des Cellulose-Abbaus unter Berücksichtigung gleicher Gesamtproteinmengen. Es wurden jeweils 8 µg Gesamtproteinmenge aufgetragen. B) Vergleich des Celluloseabbaus unter Berücksichtigung gleicher Zellzahlen. In die jeweils links ausgestanzten Löcher wurde konzentriertes Kulturmedium und in die jeweils rechts ausgestanzten Löcher wurde nicht konzentriertes Medium aufgetragen. Der pH-Wert der CMC-Platten betrug pH = 4,5. Das ca. 80fach konzentrierte Medium wurde durch Aufkonzentrieren des Kulturmediums durch Centricons erhalten.

Wie aus Abb. 31 ersichtlich ist, konnte für die Endoglucanase III die stärkste Aktivität detektiert werden. In Abb. 31A ist zu erkennen, dass sowohl im Medium und im konzentrierten Medium als auch in dem Lysat der Endoglucanase III bildenden Hefen im Vergleich zu den beiden anderen Endoglucanasen starke Enzymaktivität nachzuweisen war. Die Aktivität im Zelllysat könnte darauf hinweisen, dass die Endoglucanase III stärker exprimiert wird als die beiden anderen. Das konzentrierte Medium wurde durch ca. 80-faches Aufkonzentrieren der Proteine in Centricons erhalten. Das dabei entstandene Filtrat zeigte auf den Agarplatten keine Aktivität. Damit war sichergestellt, dass sich die gewünschten Proteine nur im Konzentrat befinden. Für die Endoglucanasen I und V wurde bei diesem Test kein Abbau der Cellulose nachgewiesen. Bei dem in Abb. 31B gezeigten Test wurden Proben aufgetragen, die von einer gleichen Zellzahl ausgingen. Hier wurde wiederum der Kulturmedienüberstand nach der Zellernte sowie konzentriertes Kulturmedium in die vorgestanzten Löcher pipettiert. In diesem Versuch konnte außerdem noch ein geringer Celluloseabbau durch das konzentrierte Medium der Endoglucanase I exprimierenden Hefen nachgewiesen werden. Es wurden also zwei Endoglucanasen erfolgreich kloniert, die von der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert und sekretiert werden.

A2-4: Verstärkte Freisetzung von Protonen

Die Destabilisierung pH-sensitiver Hüllstrukturen von Aktoren soll durch eine verstärkte Freisetzung von Protonen, die die unmittelbare Umgebung ansäuern, erreicht werden. Durch die induzierte Expression der Kinase Ptk2p soll die plasmamembranständige Protonen-pumpe Pma1p *via* Phosphorylierung aktiviert und eine vermehrte Ausscheidung von Protonen bewirkt werden. Der Leserahmen von Ptk2p wurde aus der genomischen DNA von *S. cerevisiae* amplifiziert und in das Shuttle-Plasmid p426GPD (konstitutiver *GPD*-Promotor) sowie p426Fig1 (induzierbarer *Fig1*-Promotor) kloniert. Bisher ist kein geeigneter Funktionstest für die Ansäuerung verfügbar. Daher wurde durch OEP ein dreifacher HA-Tag an den C-Terminus fusioniert, um die Expression des Proteins immunologisch nachzuweisen. Die Größe der Proteinbande von Ptk2p (Abb. 32) entspricht dem berechneten Molekulargewicht von 97 kDa. Die Kinase Ptk2p konnte erfolgreich exprimiert werden, jedoch stehen aufgrund der fehlenden Nachweismethode Analysen zur verstärkten Freisetzung von Protonen aus.

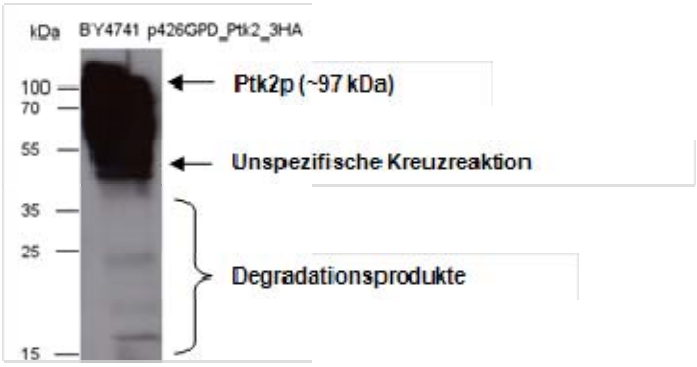


Abb. 32: Western Blot zum Nachweis der Expression von Ptk2_3HA in Hefe. Hefezellen des Stammes BY4741 wurden mit dem Konstrukt p426GPD_Ptk2_3HA transformiert. Es wurden 10 µg Gesamtzelllysat einer üN-Kultur nach Aufschluss mit Glaskugeln für die SDS-PAGE aufgetragen. Der Proteinnachweis erfolgte mit Anti-HA Antikörpern. Das erwartete Signal, mögliche Degradationsprodukte sowie unspezifische Kreuzreaktionsbanden sind gekennzeichnet. Links sind die Größenangaben des Standards angegeben.

A2-5: Erzeugung Protease-sensitiver Hydrophobin Derivate

Es soll getestet werden, inwieweit Hydrophobine, die ggf. als Hüllstruktur dienen können, mittels Proteasen abgebaut werden können.

A2-5-1: Testung der Protease-Sensitivität von Hfb1

HfbI, welches zum immunologischen Nachweis mit einem HA-tag versehen ist, wurde in *E. coli* Zellen unter Anwendung des pET-Expressionssystems (Invitrogen) exprimiert. Gesamtzelllysat wurde mit Trypsin, caseinhydrolytischem Salz sowie Proteinase K verdaut. Die Proteolyse wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analysen untersucht. Nur unter Einwirkung von Proteinase K kam es zu einem deutlichen Abbau des Hydrophobins (Daten nicht gezeigt). Um neben Proteinase K eine hochspezifische Protease zur Auflösung einer Hüllstruktur nutzbar zu machen, wurden die Arbeiten unter Punkt A2-5-2 durchgeführt.

A2-5-1: Herstellung von Hfb1-Derivaten mit maßgeschneiderter Protease-Sensitivität

Mittels OEP wurden Leseraster generiert, die für Hydrophobin-Derivate kodieren, die im inneren Bereich des Hydrophobins artifiziell eingefügte Schnittstellen zum einen für Trypsin (mHFB(1)TRP-HA), zum anderen für die TEV-Protease (mHFB(1)TEV-HA) beinhalten. Nach Klonierung der entsprechenden Fragmente in geeignete pET-Vektoren erfolgte die Tranformation in Expressionsstämme von *E. coli*. Nach Untersuchungen zur Expressionskinetik erfolgte die Erarbeitung eines geeigneten Expressionsprotokolls. Gesamtzelllysat der Zellen wurde mit den entsprechenden Proteasen inkubiert und der Abbau der Hydrophobin-Derivate mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analysen untersucht. Abb. 33 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer solchen Untersuchung. Das Derivat mHFB(1)TEV-HA ist gezielt durch Trypsin abbaubar und steht für weitergehende Untersuchungen zur Verfügung.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Spur
	mHFB(1)TEV-HA						mHFB(1)TRP-HA							Konstrukt
	nach 3h Expression						nach 5h Expression							Zellernte
	40µg						25µg							Proteinkonzentration
	TEV-Protease						Trypsin							Spaltung mit
M	uv	0+TEV	1	2	24	M	uv	0+TRP	1	2		24	M	t [h]

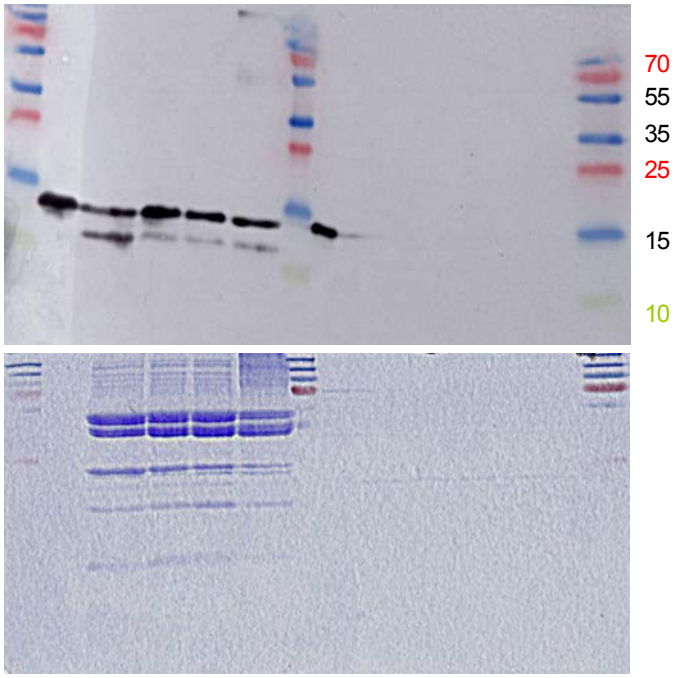


Abb. 33: Proteolytische Spaltung von Hfb1-Derivaten. Es sind die Ergebnisse der Immundetektion (oben) und das PAA-Gel nach Coomasssie-Färbung (unten) nach der Behandlung von mHFB(1)TEV-HA und mHFB(1)TRP-HA mit TEV-Protease bzw. Trypsin dargestellt. Die Zellernte erfolgte nach 3 h bzw. 5 h. Unterschiedliche Proteinkonzentrationen (für TEV-Protease-Verdau mit 40 µg, für Trypsin-Verdau 25 µg) sowie unterschiedliche Inkubationszeiten der Enzyme wurden untersucht. In den Spuren 3 bis 6 ist die Inkubation von mHFB(1)TEV-HA mit TEV-Protease nach Expression in dem *E. coli*-Stamm Rosetta Blue (nach 0, 1, 2, 24 h) dargestellt. In den Spuren 9 bis 13 ist der Trypsin-Verdau von mHFB(1)TRP-HA nach Expression in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS (nach 0, 1, 2, 4 h) dargestellt. In den Spuren 2 und 8 sind jeweils die dazugehörigen unverdauten Proben aufgetragen. Es wurde pro Spur 20 µg Gesamtzelllysat verwendet.

A3: Modul „Aktor“

Im Modul Aktor beschäftigten sich die Arbeiten mit der Generierung von Hefen, die chemische Schad- und Arzneistoffe abbauen sollen. Hierfür sollen zum einen Hefen genutzt werden, die mit Hilfe einer Genbank Derivate von Cytochrom P450 Monooxygenasen (Cyt P450) exprimieren. Zusätzlich zum ursprünglichen Arbeitsplan wurden Hefen generiert, die das Ampicillin abbauende Enzym ß-Lactamase exprimieren sowie Hefen, die das Cytochrom P450 BM3 (CYP102A1) von *Bacillus megaterium* zum Abbau von Diclofenac exprimieren.

A3-1: Aktoren zum Abbau chemischer Schad- und Arzneistoffe

A3-1-1: Herstellung einer Cytochrom P450 Monooxygenasen Genbank

In diesem Arbeitspaket sollen Hefen generiert werden, die durch Expression von rekombinanten Cytochrom P450 Monooxygenasen verschiedenste Schadstoffe abbauen können.

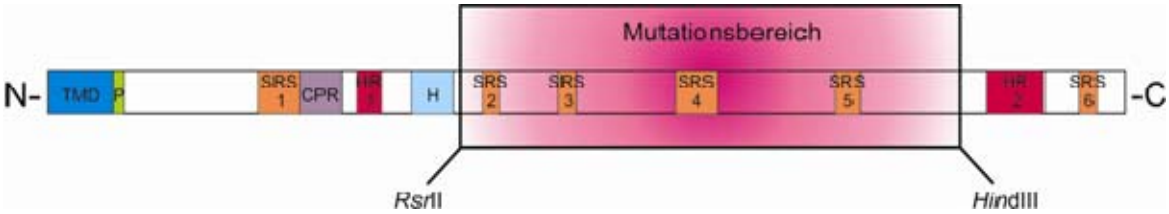


Abb. 34: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von CYP2B1
Dargestellt ist die Proteinstruktur von CYP2B1 mit den verschiedenen Domänen. Zusätzlich ist der zu mutierende Bereich angedeutet sowie die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Rsr*II und *Hin*dIII, über die der mutierte Bereich wieder in den authentischen *CYP2B1*-Leserahmens integriert werden kann. TMD: Signalsequenz fürs ER sowie Transmembrandomäne, P: Prolin-reiche Region, HR: Hämbinderegion, SRS: putative Substraterkennungsstelle, CPR: Bindestelle für NADPH-Cytochrom P450 Reduktase, H: hydrophobe Region, N: Aminoterminus, C: Carboxyterminus

Zunächst wurde der für Mutationen zur Veränderung der Substratspezifiät geeignete Bereich mittels Literaturecherche definiert (Abb. 34). Dieser Bereich umfasst die Substratbindestellen zwei bis fünf des Proteins. Zudem wurden in ersten Versuchen die Parameter für eine optimierte *in vitro* Mutationsrate bestimmt. Unter Anwendung des hierbei erstellten Arbeitsprotokolls wurde eine optimierte *CYP2B1*-Genbank hergestellt. Die Genbank wurde mittels Sequenzierung unabhängiger Klone charakterisiert. 22 % der Plasmide tragen CYP2B1-Gene ohne Mutation oder mit Fehlern (Deletion, Insertion oder vorzeitiges Stopcodon), die zu funktionsunfähigen Enzymen führen. Die restlichen 78 % der Plasmide tragen mutierte CYP2B1-Gensequenzen mit durchgehendem Leserahmen und stehen somit für Substratabbautests zur Verfügung Die Genbank weist durchschnittlich 3 Aminosäureänderungen im Mutationsbereich auf. Die mutierten *CYP2B1*-Gene stehen im

Expressionsvektor p426GPD unter der Kontrolle des konstitutiven *GPD1* Promotors. (Es wurde ein konstitutiver Promotor gewählt, um eine gleichbleibende Expression zu gewährleisten. Die ist für ein Abbauscreening hilfreich. Der induzierbare *FIG1*-Promotor kommt zum Einsatz, wenn spezifisch abbauende Klone identifiziert sind). Aus rund 500.000 unabhängigen *E. coli* Transformanden wurden fünf mg Plasmid isoliert. Diese stellen die Cytochrom P450 Genbank für *S. cerevisiae* dar.

Analog wurde eine Genbank für die Spalthefe *S. pombe* angelegt.

A3-1-1: Transformation der Genbanken in Hefe, Expressionsanalysen, Analyse der Abbauwirkung

Die Genbanken wurde in geeignete Hefezellen transformiert und die Expression von CYP2B1 mittels Western Blot gezeigt (Daten nicht gezeigt).

Da bekannt ist, dass CYP2B1 für ihre Aktivität die Gegenwart der Ratten-spezifischen NADPH-Cytochrom P450 Reduktase benötigt, wurden entsprechende Konstrukte zur Koexpression von Oxidase und Reduktase hergestellt und in Hefen zur transformiert.

Der Aktivitätsnachweis von CYP2B1 erfolgte mit dem für das Enzym spezifischen Substrat 7-Benzyloxyresorufin (sogenannte BROD-Aktivität). Bei aktivem CYP2B1 entsteht das fluoreszierende Produkt Resorufin. Die Fluoreszenzzunahme wurde im Plattenreader infinite 200 (TECAN) gemessen. Beispielhaft ist in Abb. 35 ein solcher Aktivitätsnachweis für verschiedene Hefetransformanden dargestellt.

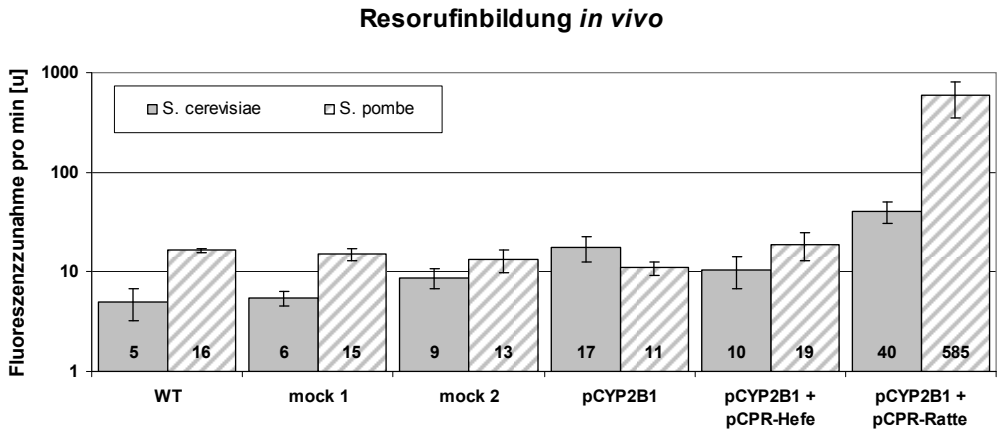


Abb. 35: CYP2B1-BROD-Aktivität *in vivo*
Die Umsetzung von 4 µM 7-Benzyloxyresorufin zum fluoreszierenden Resorufin durch das rekombinant exprimierte CYP2B1 wurde *in vivo* mit jeweils 5 x 10^6 Hefezellen anhand der Fluoreszenzzunahme bestimmt. Bei der Abbildung handelt es sich um eine logarithmische Darstellung.

Die Messungen zeigen, dass die endogene CPRs beider Hefestämme nicht in der Lage zu sein scheinen, das rekombinante CYP2B1 effizient mit Reduktionsäquivalenten zu versorgen. Bei gleichzeitiger Expression der Reduktase der Ratte kann in beiden Hefen eine Fluoreszenzzunahme erfasst werden. Bei *S. cerevisiae* ist es eine 6-fache Steigerung im

Vergleich zu den Kontrollstämmen, bei *S. pombe* sogar eine 39-fache Steigerung. Die Spalthefe scheint demnach eine wesentlich höhere CYP2B1-Aktivität als die Bäckerhefe erreichen zu können.

Untersuchungen von *S. cerevisiae* und *S. pombe* Transformanden hinsichtlich Schadstoffabbau (z.B. MTBE) führten bisher nicht zur Identifizierung eines Klons mit deutlicher Abbauleistung.

A3-1-a (Zusätzliche Arbeiten): Generierung von ß-Lactam Antibiotika abbauenden Hefen

Ziel war es, Hefen zu generieren, die Proteine exprimieren, die in der Lage sind Antibiotika abzubauen. Dafür wurde die den ß-Lactamring hydrolysierende ß-Lactamase gewählt. Zunächst wurden die Leserahmen der ß-Lactamase sowie der Signalsequenz des α-Faktor Propetids PCR-amplifiziert. Der Leserahmen der α-Faktor Signalsequenz wurde mittels OEP N-terminal an den Leserahmen der ß-Lactamase fusioniert. Des Weiteren wurde ein zweites Sekretionssignal aus *S. cerevisiae*, vom Protein Hsp150, für die Sekretion aus Hefen gewählt und ebenfalls über OEP an den N-Terminus der ß-Lactamase fusioniert. Die Amplifikate wurden in das Shuttle-Plasmid p426GPD kloniert. Nach Transformation in *S. cerevisiae* BY4741 wurde die Expression sowie Sekretion der ß-Lactamase aus der Hefezelle mit Hilfe der Cephalosporin-ähnlichen Verbindung Nitrocefin analysiert (Abb. 36). Nitrocefin verfärbt sich nach Spaltung des ß-Lactamrings durch die ß-Lactamase von gelb nach rot.

Inkubation 1 min	Kontrolle p426GPD	MFα_ β-Lactamase	Hsp150_ β-Lactamase
Medium 1x			
Mediumkonzentrat			

Inkubation 40 min	Kontrolle p426GPD	MFα_ β-Lactamase	Hsp150_ β-Lactamase
Medium 1x			
Mediumkonzentrat			

Abb. 36: Nitrocefin-Test mit Medienüberständen aus Übernachtkulturen ß-Lactamase exprimierender Hefen. Verglichen wird die Effizienz der Sekretionssignale, um ß-Lactamase in das Kulturmedium zu sekretieren. Medium 1x entspricht dem Kulturmedium einer Übernachtkultur, Mediumkonzentrat entspricht dem ca. 80-fach konzentrierten Kulturmedium.

Aus einer Übernachtkultur wurden Kulturmengen gleicher OD_{600} abgenommen und die Zellen geerntet. Für die Untersuchung wurden jeweils gleiche Volumina der Überstände (Medium 1x) und konzentrierter Überstände (Mediumkonzentrat) eingesetzt. Zu den Proben wurden 5 µl Nitrocefin-Arbeitslösung hinzu gegeben und diese bei Raumtemperatur inkubiert. Bereits nach 1 min Inkubation zeigt sich bei den Proben der konzentrierten Überstände, dass sowohl die β-Lactamase mit α-Faktor-Sektretionssignal als auch mit dem Sekretionssignal von Hsp150p exprimiert und sekretiert werden. Dabei wird deutlich, dass das Sekretionssignal von Hsp150p eine effizientere Sekretion der β-Lactamase ermöglicht und zu einer deutlich stärkeren Rotfärbung führt. Nach einer 40-minütigen Inkubation kann dieses Ergebnis auch für die nicht konzentrierten Überstände festgestellt werden. Durch die Rotfärbung konnte die erfolgreiche Expression und Sekretion der ß-Lactamase belegt werden, wobei sich das Sekretionssignal von Hsp150 als das effizientere Sekretionssignal herausstellte.

A3-1-b (zusätzliche Arbeiten): Abbau von Diclofenac

Als Aktor zur Umsetzung diverser Schadstoffe wurde das Cytochrom P450 BM3 (CYP102A1) von *Bacillus megaterium* verwendet. Das native Enzym besitzt eine besonders hohe Aktivität gegenüber seinen natürlichen Substraten, wie Fettsäuren. Die Gene für das Enzym sowie für eine Variante mit 7 Mutationen, Cytochrom P450 BM3 M11 (R47L/E64G/F81I/F87V/E143G/L188Q/E267V) (Van Vugt-Lussenburg *et al.*, 2007), die eine erhöhte Aktivität gegenüber diversen Medikamenten einschließlich Diclofenac aufweist, wurden kloniert und zur heterologen Expression in *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* transformiert. Die Expression der mit einem His-Tag versehenen Proteine konnte mittels Western Blot unter Verwendung markierter Anti-His-Antikörper in beiden Hefestämmen nachgewiesen werden (Abb. 37).

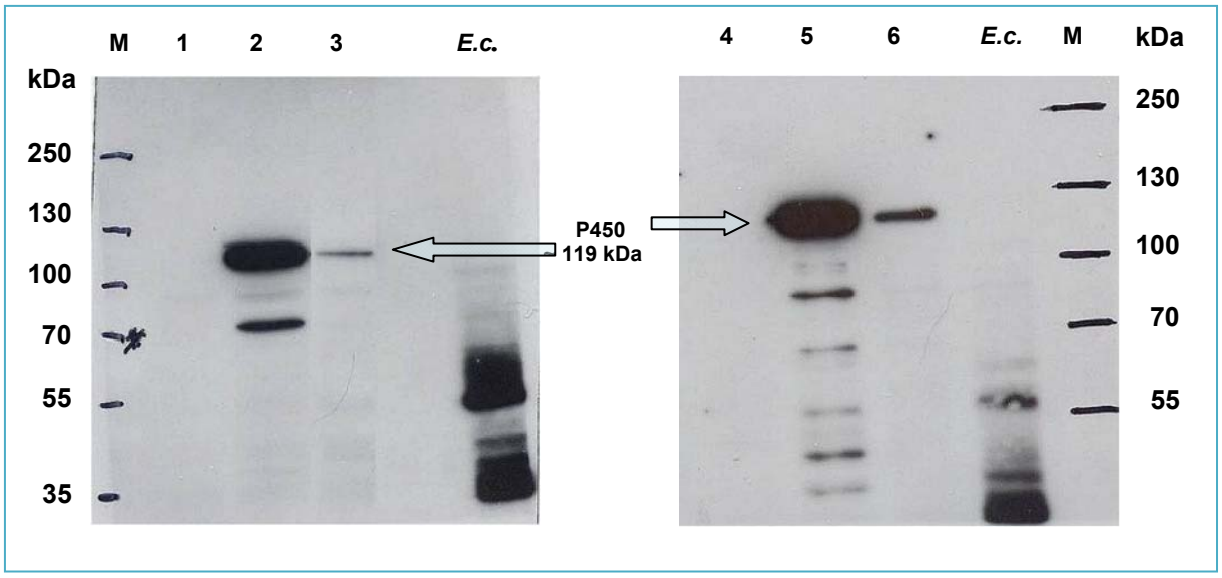


Abb 37: Expression von P450 BM3 und P450 BM3 M11 in *S. cerevisiae* (links) und *S. pombe* (rechts)

Die mit einem His-Tag versehenen Proteine konnten mithilfe eines Anti-His-Tag-Antikörpers (gekoppelt an Meerrettichperoxidase) nach dem Western Blot detektiert und durch Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

M: Größenmarker; *E.c.: E. coli* HA-tRFP als Positivkontrolle für His-Tag

Linkes Bild: *S. cerevisiae*
1: mit leerem Plasmid p426_GPD
2: Expression von P450 BM3 (nativ)
3: Expression von P450 BM3 M11 (mutiert)

Rechtes Bild: *S. pombe*
4: mit leerem Plasmid pJR1_3XL
5: Expression von P450 BM3 (nativ)
6: Expression von P450 BM3 M11 (mutiert)

Das Wachstum wurde für *S. cerevisiae* ermittelt. Als Antwort auf höhere Diclofenac-Konzentrationen zeigen die Hefen eine Wachstumshemmung, die bei Abbau von Diclofenac durch Expression von Cytochrom P450 -BM3 M11 noch verstärkt ist (van Leeuwen *et al.*, 2011). Durch heterologe Expression von zwei Cytochrom P450 Varianten, dem nativen BM3 und der Mutante BM3 M11, konnte diese verstärkte Wachstumshemmung nachgewiesen werden (Abb. 38).

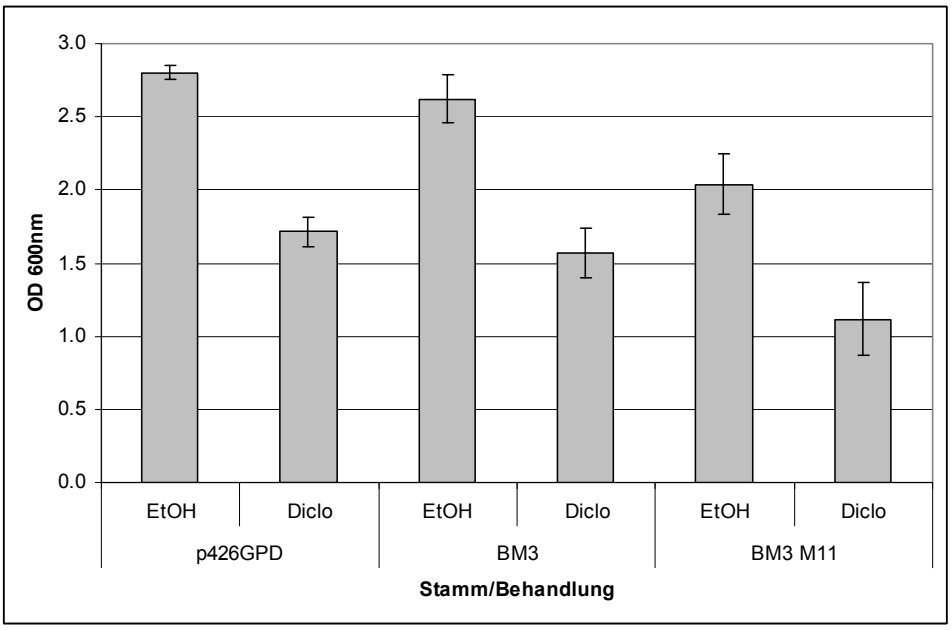


Abb. 38: Wachstumsverhalten des Wildtyps BY4741 (mit leerem Plasmid p426GPD) und der Stämme, die das native BM3 bzw. die mutierte Variante BM3 M11 überexprimieren. Antwort nach 7 Stunden, Diclofenac (75 µM). Kontrollstämme wurden mit dem Lösungsmittel (EtOH) behandelt.

Die Wachstumshemmung in Prozent zur jeweiligen Kontrollbehandlung ergab folgende Werte: Wildtyp BY4741 (61.12%), BM3 (59.85%) und BM3 M11 (54.74%), d.h. sowohl die Überexpression des nativen Cytochroms P450 (BM3) und v.a. die der Mutante (BM3 M11) führen zu einer verstärkten Wachstumshemmung, was auf einen Diclofenac Abbau zurückzuführen ist.

A3-2 Aktoren zur gerichteten Änderung der Zelloberflächenladung

Aktoren zur gerichteten Änderung der Zelloberflächenladung sollten erzeugt werden, um die Hefezellen, die Kupfer aufgenommen und gebunden haben, an einer Oberfläche mit entgegen gerichteter Ladung zu adsorbieren. Dafür wurden zum einen die in Abschnitt A 1-2-3 genannten Hefelinien erzeugt, die hohe Kupfermengen akkumulieren und zum anderen die aus Abschnitt A 1-2-5 genannten kupferinduzierten Promotoren kloniert. Um eine Änderung der Zelloberflächenladung zu erhalten, wurden die Leserahmen der Oberflächenproteine Aga1p und Aga2p aus der genomischen DNA von *S. cerevisiae* amplifiziert. Es werden beide Proteine benötigt, da Aga2p eine Untereinheit von A-Agglutinin ist, welche über zwei Disulfidbrücken mit Aga1p verbunden ist und somit bei Überexpression von Aga2p auch mehr Aga1p zur Verfügung stehen sollte. Um die Expression des Zellwand-verankerten Aga1p immunologisch nachzuweisen, wurde mittels OEP ein 3x HA-Tag zwischen die Aminosäuren 541 und 542 eingefügt (Huang *et al.*, 2003). Die Änderung der Zelloberflächenladung sollte durch das Anfügen mehrerer negativ bzw. positiv geladener Aminosäuren an den C-Terminus von Aga2p erfolgen. Zum einen wurden an den C-

Terminus von Aga2 mittels PCR ein cMyc-Tag sowie 12 negativ geladene Aminosäuren (Asp und Glu) angefügt und zum anderen wurde ein Aga2-Konstrukt erzeugt, an das mittels PCR 12 positiv geladene Aminosäuren (Arg, Lys, His) fusioniert wurden. Hier sollte der cMyc-Tag des negativ geladenen Aga2p sowie ein 6-facher His-Tag des positiv geladenen Aga2p zum immunologischen Nachweis der Proteinexpression dienen. Die Amplifikate wurden in Shuttle-Plasmide kloniert. Dabei wurde für Aga1HAintern p426GPD (*URA3*-Marker) und für die Aga2-Konstrukte p423GPD (*HIS3*-Marker) gewählt. Die unterschiedlichen auxotrophen Marker gestatten eine gleichzeitige Expression beider Proteine in einem Hefestamm. Die in *E. coli* vermehrten Plasmide wurden in die Hefen *S. cerevisiae* BY4741 bzw. BY4741*Δctr1* transformiert. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Expression der Proteine mittels Western Blot und Immundetektion (Abb. 39).

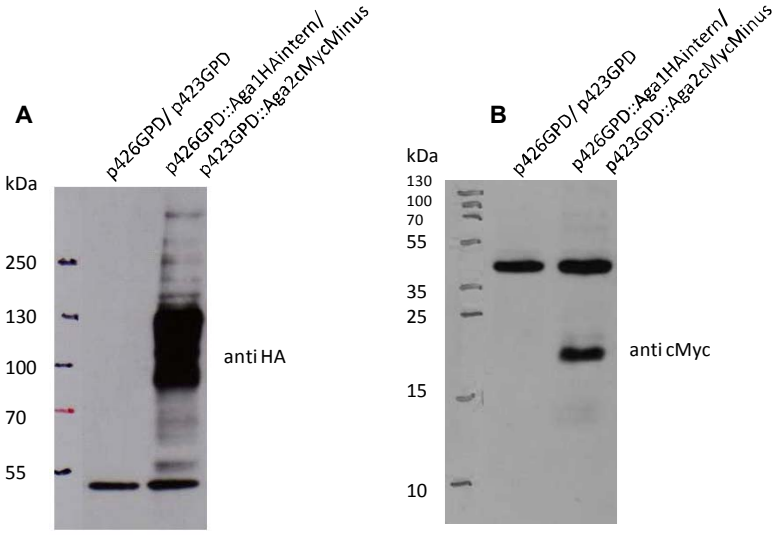


Abb. 39: Western Blot nach paralleler Expression von Aga1HAintern und Aga2cMycminus in *S. cerevisiae* BY4741*Δctr1*. Es wurden jeweils 15 µg Gesamtprotein des Zelllysats aufgetragen. A) zeigt die Expression von Aga1HAintern, das mit einem monoklonalen HA-Antikörper detektiert wurde. B) zeigt die Expression von Aga2cMycMinus, das durch einen monoklonalen cMyc-Antikörper detektiert wurde.

Die Proteine, die gleichzeitig in einem Hefestamm exprimiert wurden, lassen sich wegen der unterschiedlichen Epitope getrennt voneinander immunologisch detektieren. Aga1HAintern weist drei glycosylierte Formen auf (Huang *et al*., 2003), welche in der Abb. 39A zu erkennen sind. Aga2cMycMinus konnte bei einem Molekulargewicht von 22 kDa detektiert werden (Abb. 39B), welches ebenfalls auf Glycosylierung zurückzuführen ist (Watzele *et a*l., 1988). Für Aga2Plus konnte keine Expression nachgewiesen werden, daher wurde es für weitere Versuche zur Oberflächenladung nicht mehr mitgeführt.

Die gerichtete Änderung der Zelloberflächenladung wurde mit Hilfe des Farbstoffes Alcian Blau tetrakis (methyl-pyridinium) chlorid durchgeführt. Dieser Phtalocyaninkomplex besitzt vier positive Ladungen und wird durch negativ geladene Zelloberflächen adsorbiert.

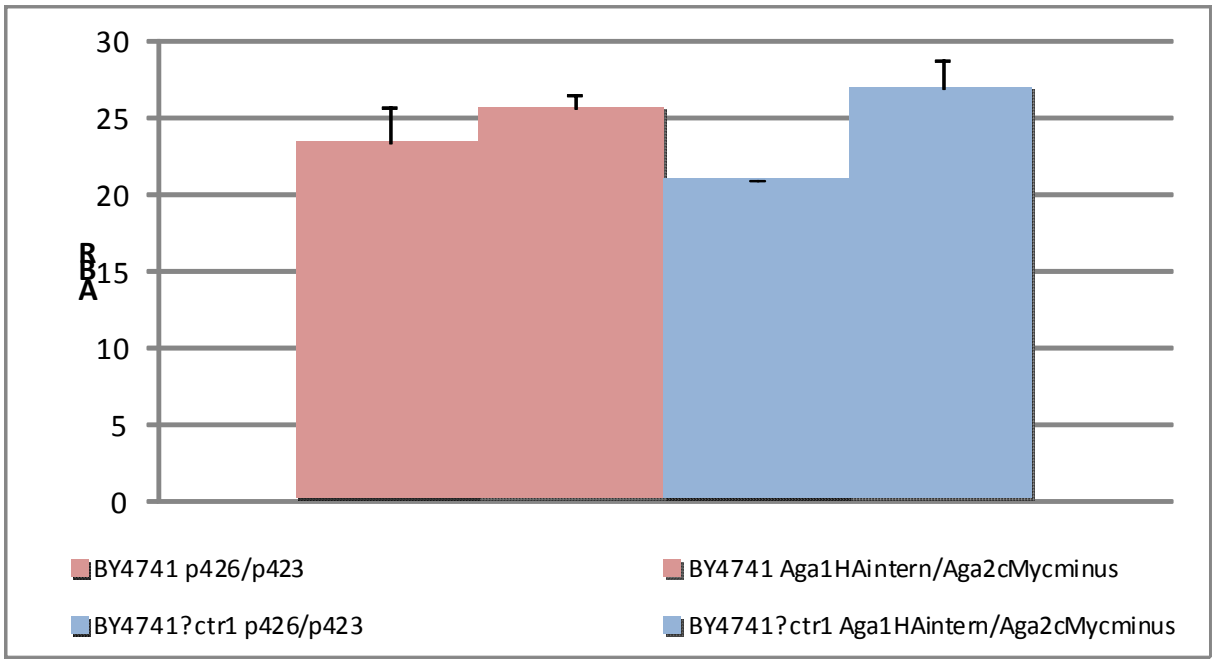


Abb. 40: Alcian Blau Retentionsrate (ABR). Darstellung der ABR für den Doppelexpressionsstamm BY4741 und den Doppelexpressionsstamm BY4741*Δctr1*, die jeweils Aga1p und Aga2p mit negativer Ladung exprimieren.

Für den Nachweis einer verstärkt negativen Zelloberfläche wurden Proben gleicher Zellzahl in einer Alcian-Blau-Lösung inkubiert. Die negative Ladung von Hefezellen sollte durch die Überexpression von Aga2cMycMinus verstärkt werden. Nach Inkubation der Zellen in der Alcian-Blau-Lösung wurden die Zellen geerntet und die Absorption des Überstandes bei 615 nm gemessen. Je mehr Alcian Blau an der Hefezellwand gebunden wurde, desto niedriger war die Absorption der Lösung. Daraus wurde anschließend die Alcian Blau Retentionsrate (ABR), welche den Grad der negativen Ladung beschreibt, berechnet. Dabei weisen höhere Werte auf eine stärkere negative Ladung hin. Aga1HAintern und Aga2cMycMinus wurden sowohl in dem Wildtypstamm als auch in dem Deletionsstamm gleichzeitig überexprimiert und hinsichtlich ihrer negativ geladenen Zelloberflächen untersucht. Aus Abb. 40 wird ersichtlich, dass für beide Fälle die Expressionsstämme eine höhere negative Ladung als die Kontrollstämme mit leeren Plasmiden aufweisen. Die Expression, bislang unter der Kontrolle eines konstitutiven starken Promotors, muss unter die Kontrolle induzierbarer Promotoren gestellt werden, z.B. Kupfer induzierbare Promotoren. Es wurden erfolgreich Hefezellen generiert, die als Aktoren zur gerichteten Änderung der Zelloberflächenladung eingesetzt werden könnten.

Die entsprechenden Hefen wurden den Partnern zur Verfügung gestellt.

A4: Modul „Demonstrator“

Im Modul Demonstrator sollten die entwickelten Module zu einem Lösungsystem für spezifische Fragestellungen zusammengeführt werden. Für das IfG lag hier der Schwerpunkt in der Bereitstellung der benötigten biologischen Komponenten.

A4-1: Demonstrator: Selbst aktivierende Filter für chemische Schad- und Arzneistoffe

Für diesen Demonstrator wurden geeignete biologische Komponenten den Partnern vom IfWW zur Verfügung gestellt (siehe Arbeitsbericht IfWW). Die Generierung der entsprechenden Hefen ist weiter oben im Arbeitsbericht des IfG detailiert beschrieben.

A4-2: Demonstrator: Selbst regulierende Zelladsorption zur Rückgewinnung von Metallionen

Hefen mit erhöhtem Kupfergehalt und veränderter Oberflächenladung wurden generiert und den Partnern zur Verfügung gestellt. Einzelheiten sind dem Arbeitsbericht des IfWW zu entnehmen.

A4-3: Demonstrator: Monitoring der Expression und Prozessierung von Poly-Hydrophobin

Der Aufbau des exemplarischen Produktionsprozesses erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem ILBT. Einzelheiten finden sich im entsprechenden Arbeitsbericht des Institutes.

A4-4: Demonstrator: Quorum-sensing basierte Überwachung von Wässern

Bis zum Projektende gelang es nicht, rekombinanten Hefen mit einem aktiven „LuxP-Rezeptor“ zu generieren. Daher steht die Realisierung dieses Demonstrators aus.

Literatur

Gross C., Kelleher M., Iyer V.R., Brown P.O. and Winge D.R. (2000) Identification of the Copper Regulon in Saccharomyces cerevisiae by DNA Microarrays, JBC, 275: 32310–32316

Huang G., Zhang M. and Erdman S.E. (2003) Posttranslational Modifications Required for Cell Surface Localization and Function of the Fungal Adhesin Aga1p, Eukaryotic Cell, 2: 1099–1114

Ooi C.E., Rabinovich E., Dancis A., Bonifacinol J.S. and Klausner R.D. (1996) Copper-dependent degradation of the Saccharomyces cerevisiae plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis, The EMBO J, 15: 3515-3523

Van Leeuwen J.S., Vredenburg G., Dragovic S., Tjong T.F.J., Vos J.C. and Vermeulen N.P.E. (2011), Metabolism related toxicity of diclofenac in yeast as model system, Toxicol Letters, 200: 162–168.

Van Vugt-Lussenburg B.M.A., Stjernschantz E., Lastdrager J., Oostenbrink C., Vermeulen N.P.E. and Commandeur J.N.M. (2007), Identification of Critical Residues in Novel Drug Metabolizing Mutants of Cytochrome P450 BM3 Using Random Mutagenesis, J Medicinal Chem, 50: 455-461.

Watzele M., Klis' F. and Tanner W. (1988) Purification and characterization of the inducible a agglutinin of *Saccharomyces cerevisiae*, EMBO J, 7: 1483- 1488

Wu X., Sinani D., Kim H. and Lee J. (2009) Copper Transport Activity of Yeast Ctr1 Is Down-regulated via Its C Terminus in Response to Excess Copper, JBC, 284: 4112–4122

Yasokawa D., Murata S., Kitagawa E., Iwahashi, Y., Nakagawa, R., Hashido T. and Iwahashi H. (2008) Mechanisms of Copper Toxicity in Saccharomyces cerevisiae Determined by Microarray Analysis, Environ Toxicology, 23: 599-606

1.1 Modul Sensor (A1)

1.1.1 Technologieentwicklung zur Immobilisierung von gentechnisch modifizierten Hefezellen in unterschiedlichen geometrischen Anordnungen (A 1-1)

Ziel dieses Arbeitspaketes war es, für die vom IfG gentechnisch modifizierten Hefezellen geeignete Methoden zur Immobilisierung in Trägermaterialien zu entwickeln, die eine stabile Funktion als Ganzzellsensor unter verschiedenen Einsatzbedingungen ermöglichen. Hierbei wurden drei sich in ihrer geometrischen Ausbildung unterscheidende Varianten ausgearbeitet: die Immobilisierung der Hefezellen (i) in sphärischen Kernmatrizen, (ii) in planaren Beschichtungen mit ortsfester Verankerung auf einem Träger sowie (iii) in dreidimensionalen Fasernetzwerken.

Als Modellorganismus zur Untersuchung der unterschiedlichen Verkapselungstechnologien wurde *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (Wildtyp) eingesetzt.

1.1.1.1 Sphärische Kernmatrizen

Aufbauend auf Vorarbeiten wurde die Immobilisierung der Hefezellen in ionisch quervernetzten Alginatkugeln (Durchmesser 3 mm) begonnen. Hierzu wurde eine aufkonzentrierte Übernachtkultur von *Saccharomyces cerevisiae* BY 4741 in eine Alginatlösung eingerührt, das nunmehr 2%-ige Alginat wurde dann unter Rühren in einer 0,1 M Calciumchloridlösung vernetzt. Zur Stabilisierung wurden die Kugeln mit einer Stützschale aus kolloidalem Silica beschichtet. Da es im Verlauf der Beschichtung durch das Aufbringen kationischer Polymere zu Quellungs- oder Schrumpfungserscheinungen des Alginates kam und folglich zu Brüchen der Silica-Stützschale, wurde zur Herstellung der Kugeln mittels Koacervation übergegangen, indem das Alginat mit Ludox gemischt und in kationische Polymere enthaltene Calciumchloridlösung eingetropft wurde. Immobilisierte Hefezellen überlebten die Trocknung dieser Kugeln. Eine Ummantelung der Alginatkugeln mit einer Silicat-Membran aus 3-Aminopropyltrimethoxysilan und TMOS lieferte ebenfalls stabile Kugeln, jedoch war die Überlebensfähigkeit der Zellen bei dieser Variante sehr gering.

Ionisch crossgelinkte Hydrogele sind nur bedingt mechanisch stabil, da die Gefahr des Wiederherauslösens der Calciumionen besteht. Zur Verbesserung dieser Kernmatrix wurde darum Alginat methacryliert und in Anwesenheit von Photoinitiatoren im sichtbaren Licht photovernetzt. Durch gründliches Herauswaschen von Methacrylsäureresten konnte auch die Vitalität der Hefezellen in der Alginatmatrix beibehalten werden. Abb. 2 lässt nicht nur die

erhöhte Pufferstabilität des Photoalginats erkennen, sondern auch das ausbleibende Quellungs- bzw. Schrumpfungsverhalten, welches das Photoalginat besonders für den Aufbau sequentieller Beschichtungen z. B. mit Polyelektrolyten attraktiv macht.

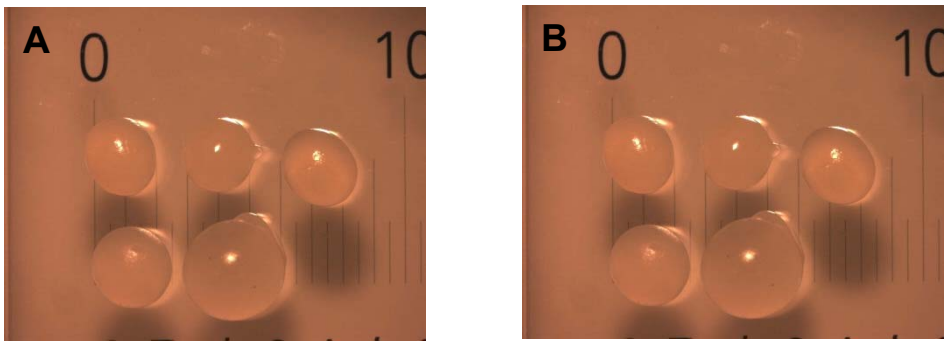


Abb. 2: Stabilität von photovernetztem (obere Reihe) und ionisch crossgelinktem Alginat (untere Reihe) A Tris-, HEPES-, Citrat-Puffer (0,05M) zur Auflösung ionisch crossgelinkten Alginats; B PBS-Puffer: pH 5; 6; 8

1.1.1.2 Planare Beschichtungen mit ortsfester Verankerung auf einem Träger

Mit Hilfe eines Nanoplotters soll die Alginat/Siliciumoxid-Matrix planar auf Objektträger aufgebracht werden. Durch Implementierung zusätzlicher Programmroutinen konnte die Konfiguration des Nanoplotters dahingehend optimiert werden, dass die Zeit zwischen Aufbringen des Alginates, in das die Hefezellen eingebettet waren, mittels Mikrodosierventil und nachfolgender Applikation des Sol-Gels mit einer Pipette kontrolliert eingestellt werden kann und unterschiedliche Array-Geometrien realisiert werden können (Abb. 3).

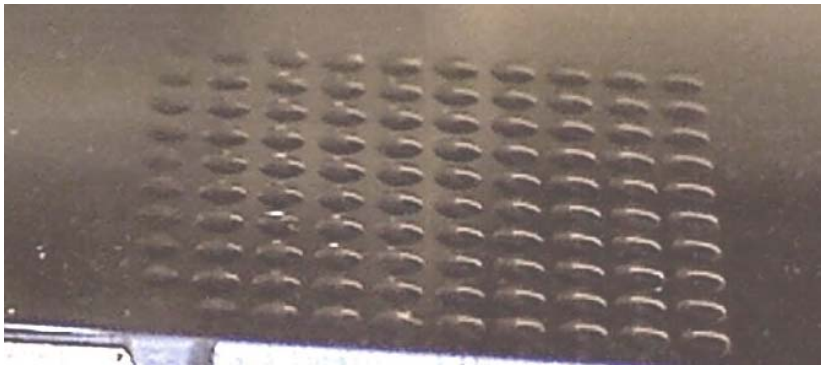


Abb. 3: Nanogeplottetes 10 x 10-Array (Alginat, Gesamtlänge 1 cm)

1.1.1.3 Immobilisierung in dreidimensionalen Fasernetzwerken

Für den Aufbau dreidimensionaler Sensorstrukturen wurden Carbonfilz und Glasvlies als Trägermaterial eingesetzt. Durch sequentielle Tauchbeschichtung des Trägermaterials mit Polylysin, Alginat mit eingebetteten Hefezellen, Calciumchlorid und modifiziertem Silicasol (M156A) konnten Hefen auf den Fasern fixiert werden (Abb. 4 A). Der Nachweis der alkoholischen Gärung der Hefezellen zeigte, dass die Zellen auch im getrockneten Substrat

überlebten. Hydrodynamische Untersuchungen stellten sicher, dass keine Zellen ausgewaschen wurden. Durch den Zusatz zusätzlicher Porogene wurden zusätzliche Transportkanäle für die Versorgung der Hefezellen mit Nährstoffen sowie den Analyten in der Beschichtung erzeugt (Abb. 4 B).

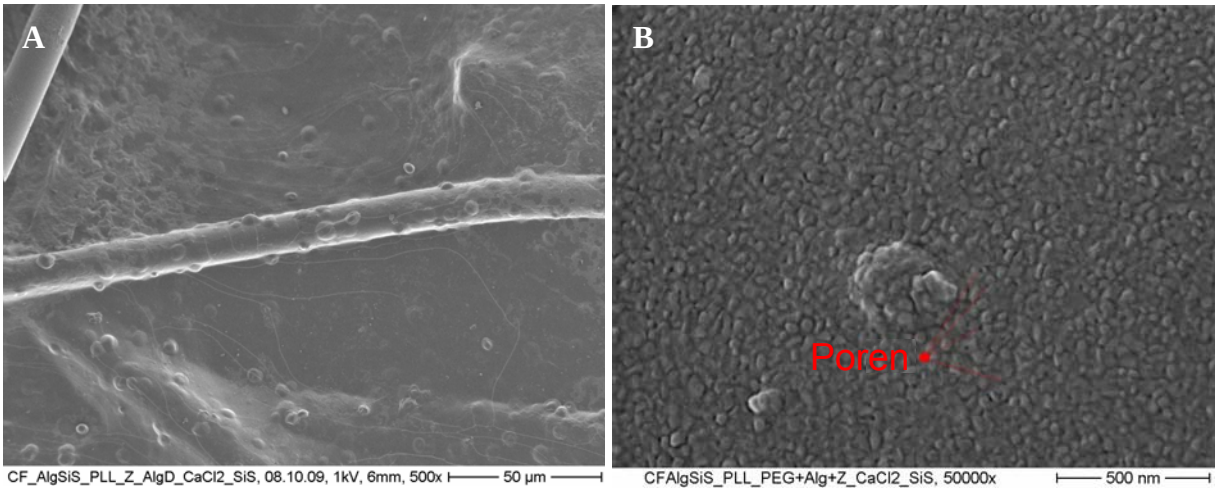
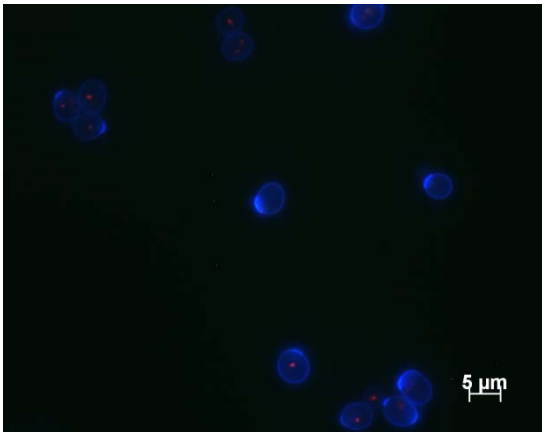


Abb. 4: REM-Aufnahme von immobilisierten Hefezellen (A) auf einer beschichteten Faser des Carbonfilzes, (B) entstandene Poren durch den Zusatz von Polyethylenglykol

1.1.2 Langzeitstabilität der Ganzzellsensoren (A 1-2)

Die Lebensfähigkeit der eingebetteten Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch mit einer Live/Dead-Färbung bestimmt. Es wurden etwa 30-50% überlebende Hefezellen in den planaren Strukturen nachgewiesen.

Aufgrund der hohen Stabilität des GFP's muss die nach Lagerung der in A 1-1 hergestellten Varianten nachgewiesene GFP-Fluoreszenz nicht zwangsläufig mit der Lebensfähigkeit der Zellen einhergehen (vgl. Abb. 5). Die beste Induktion der Expression von GFP war nur in frisch (innerhalb einer Woche) transformierten Hefen zu beobachten und stellt somit einen limitierenden Faktor für die Lagerung der Sensormodule dar. Eine Erhöhung der Lagerfähigkeit ließe sich in Hefen erzielen, in denen das Konstrukt genomisch integriert vorliegt. Aufgrund der geringeren zu erwartenden Fluoreszenz-Ausbeute wurde diese Variante im Rahmen dieses Projektes nicht näher untersucht.



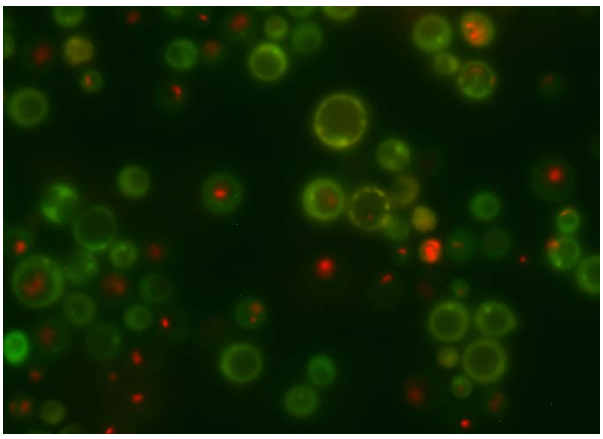


Abb. 5: Live/Dead-Färbung von *S. c.* BY 4741 (links) (lebend= rote Färbung von intravakuolären Strukturen; blau=Zellwand); Live/Dead-Färbung GFP exprimierender Hefe (rechts) (grün=GFP; rot=lebende Zelle)

1.2 Modul Schalter (A 2)

1.2.1 Entwicklung von enzymatisch schaltbaren Hüllstrukturen

Zur Entwicklung enzymatisch schaltbarer Hüllstrukturen wurden verschiedene Polymere gescreent. Die Anforderungen an die Hüllstruktur bestanden aus Stabilität, Abbaubarkeit bzw. Permeabilisierbarkeit der Hüllstruktur und Biokompatibilität für die Varianten, in denen lebende Aktorzellen eingebettet werden sollten (vgl. A 3-1), in Kombination jedoch mit einem Materialverhalten, das eine Zugänglichkeit von Wasser und Nährstoffen zu den Zellen dahingehend einschränkt, dass die Zellen in einem metabolisch inaktivem Zustand verweilen. In die Untersuchungen wurden Polyester, Cellulose und Chitosan und die verschiedenen Derivate dieser Polymere einbezogen. Während der Unterauftragnehmer GMBU e. V. sich mit enzymatisch abbaubaren Hüllstrukturen auf Cellulosebasis und Polyestern beschäftigte, befassten sich die Arbeiten am IfWW mit chitosanhaltigen Hüllstrukturen.

- <u>Polyester</u>

Mit Lipasen und Proteasen konnte ein enzymatischer Angriff der aliphatischen Homopolyester Polycaprolacton (PCL) und Polymilchsäure (PLA), nicht jedoch von Polystyren (PS) gezeigt werden. Nach 7-tägiger Inkubation der PLA-Pellets in Proteinase-Lösung (30 U/ml) konnte ein 15%iger Gewichtsverlust der Pellets verzeichnet werden, allerdings erwies sich PLA generell in wässrigen Medien als nicht stabil. Die Abbaubarkeit des in Pufferlösungen stabilen PCLs hängt u. a. vom Anteil amorpher und kristalliner Bereiche ab, so konnte bei durch Aufschmelzung (Schmelztemperatur > 60°C) hergestellten PCL-Pellets ein höherer Abbau im Vergleich zu mit Lösungsmitteln hergestellten Pellets

beobachtet werden. Da dieser jedoch im Bereich von Wochen liegt, wurde die weitere Verfolgung der aliphatische Homopolyester als geeignete schaltbare Aktorhüllstruktur für Sensor-Aktor-Systeme ausgeschlossen.

- Cellulose und deren Derivate

Die enzymatische Abbaubarkeit verschiedener Cellulosederivate wurde mit Hilfe des Enzymcocktails Cellulase Onozuka R-10 (gewonnen aus dem Schimmelpilz *Trichoderma viride*, Merck) untersucht. Die Abbaubarkeit der untersuchten Cellulosen ist in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1: Abbaubarkeit verschieden modifizierter Cellulosen und Cellulosederivate mit dem Enzymgemisch Cellulose Onozuka R-10 (Versuchsbedingungen: 6 U/ml, pH 4,8, 30°C)

leicht abbaubar	nicht oder schwer abbaubar
Carboxymethylcellulose (CMC)	Celluloseacetat
Kationische Hydroxyethylcellulose (Celquat SC230M, SC240C, H-100 und L-200)	Hydroxypropylcellulose
Lyocell	BelCoTex-Fasern
Microcellulose MCC5	Bakterielles Cellulose-Fleece
Natriumcellulosesulfat	

Als das am leichtesten und schnellsten enzymatisch in Glukoseeinheiten spaltbare Cellulosederivat erwies sich Carboxymethylcellulose (CMC). Um die Enzymaktivität in den physiologisch interessanten Bereichen auszutesten, wurde zum einen der pH-Wert der Pufferlösung variiert (pH 4,8 und pH 8) und zum anderen der Abbau bei 4°C und bei 30°C verfolgt. In Abb. 6 ist der zeitliche Verlauf der Entstehung von freier und endständig gebundener Glukose während der Einwirkung unterschiedlicher Enzymkonzentrationen dargestellt.

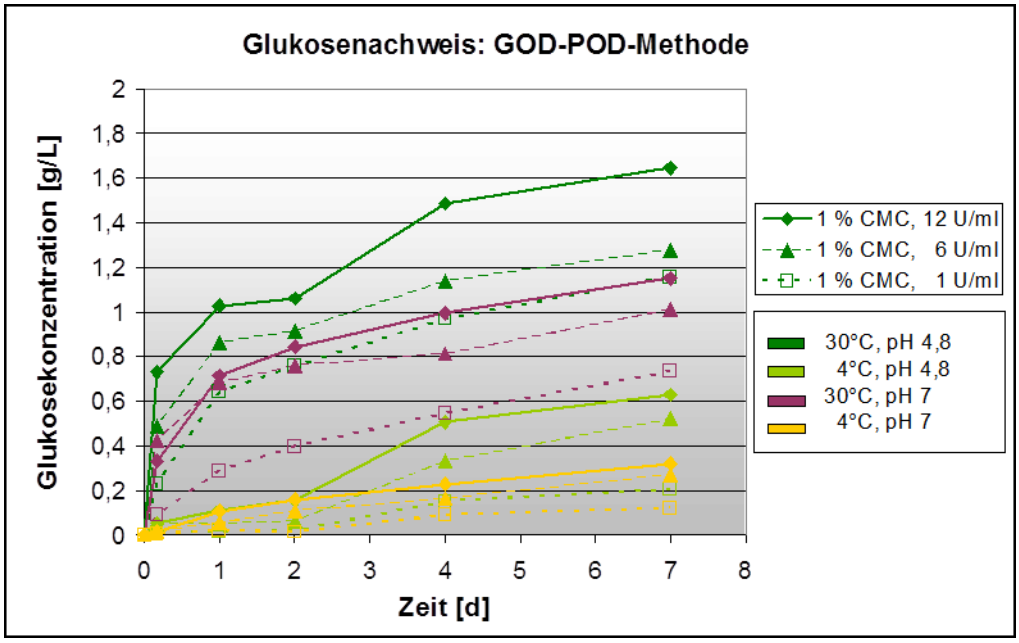


Abb. 6: Einfluss verschiedener Reaktionsbedingungen (Enzymkonzentration, Temperatur, pH-Wert) auf den enzymatischen Verdau von Carboxmethylcellulose (CMC) mittels Cellulase Onozuka R-10. Nachweis der entstehenden Glukoseeinheiten mit Hilfe der GOD-POD-Methode

Den größten Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit hat die Temperatur; bei 30°C konnte bereits nach einer Stunde ein hoher Anteil an freigesetzten und endständig gebundenen Glukosemolekülen nachgewiesen werden. CMC scheint somit ein guter Kandidat für den Aufbau einer enzymatisch relativ schnell spaltbaren Hüllstruktur zu sein. Zudem handelt es sich bei CMC um einen Polyelektrolyten (PE) mit negativ geladenen Gruppen, so dass hier zum einen die Möglichkeit des Schichtaufbaus mittels der Layer-by-Layer-Technik (LbL-Technik) und andererseits die Option zur Quervernetzung mit Polykationen bestehen. Mittels der LbL-Technik wurden abwechselnd Schichten des Polykations Polyethylenimin (PEI) und CMC auf negativ geladene Alginatkugeln (ø 1-2 mm) aufgebracht. Insgesamt wurden so vier Doppelschichten assembliert.

Der enzymatische Abbau der Hüllstruktur wurde fluoreszenzmikroskopisch durch die Diffusion von FITC markiertem Dextran (MW ≈ 70 000 kDA) in das Kugelinnere verfolgt. Bei pH 7 konnte unter Cellulolyse eine höhere Durchlässigkeit der Kugeln gezeigt werden, allerdings unter Destabilisierung der Alginatmatrix (Abb. 7).

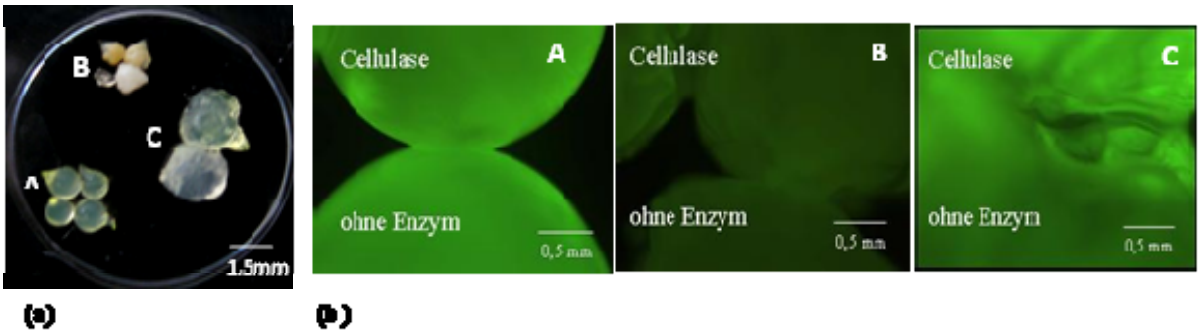


Abb. 7: (a) Foto und (b) fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit (PEI/CMC)4 ummantelten Alginatkugeln nach 4h Inkubation in 0,2% FITC-Dextran (MW≈70 kDa) in Anwesenheit (obere Reihe) bzw. in Abwesenheit (untere Reihe) von Cellulase Onozuka R-10:
(A) Kontrolle, unbeschichtet; (B und C) mit (PEI/CMC)4 beschichtet, (B) pH-Wert der Beschichtungslösung nicht geregelt bzw. (C) auf pH 7 eingestellt.

Durch Eintropfen des kationischen Cellulosederivats Celquat in anionische Carboxymethylcelluloselösung konnten stabile Immobilisierungsmatrices hergestellt werden, die nach Zusatz von Cellulase (Cellulasegemisch bei 42°C) innerhalb 1 h aufgelöst wurden. Des Weiteren wurden verschiedene Cellulose/Silika-Kompositmaterialien untersucht. Es zeigte sich, dass mittels aminofunktionalisierter Sole CMC vernetzt werden kann und durch Eintropfen einer 2%igen CMC-Lösung stabile Kugeln erzeugt werden. Diese konnten mittels des gewählten Enzymkomplexes (Cellulase Onozuka R-10) jedoch nicht aufgelöst werden. Mit Celquat konnten nur mittels Wasserglas stabile Cellulose/Silika/Komposite erzeugt werden. Hierbei hat der pH-Wert der Wasserglaslösung einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die Abbaubarkeit als auch auf die Herstellbarkeit der Cellulose-Silika-Komposite. Nur im pH-Bereich von pH 11-13 bzw. pH 3-4 konnten stabile Cellulose/Silika/Komposite erzeugt werden.

Versuche mit *S. cerevisiae* BY4741 zeigten, dass die Zellen eine Immobilisierung in Celquat/CMC-, Cellulose/Alginat- und Cellulose/Silika-Kompositmaterialien überlebten. Aufgrund der Durchlässigkeit der Matrix für Wasser und Nährstoffe blieben die Hefezellen vital und metabolisch aktiv, eine Inaktivierung und Hemmung der Zellteilung konnte mit dieser Immobilisierung nicht erzielt werden.

- <u>Chitosan und dessen Derivate</u>

Das durch Deacetylierung von Chitin gewonnene Polymer Chitosan bot sich ebenfalls für den Aufbau enzymatisch abbaubarer Hüllstrukturen an. Zunächst wurden Chitosane mit unterschiedlichen Deacetylierungsgraden und Chitosanderivate auf die Eignung zum Aufbau von stabilen Hüllstrukturen getestet (Tab. 2). Bis auf Carboxymethylchitosan ließen sich durch Eintropfen einer 2%-igen Lösung in eine 0,1 M Lösung des ionischen Crosslinkers Natriumtripolyphosphat stabile Immobilisierungsmatrices herstellen, die durch Einwirkung des Enzyms Chitosanase degradierbar waren. Die geringe Viskosität des

Carboxymethylchitosans, verglichen mit den übrigen untersuchten Chitosanen, ist wahrscheinlich für das Ausbleiben der Kugelformation verantwortlich, bei einer Heraufsetzung der Konzentration über 2% wird jedoch die Löslichkeit des Carboxymethylchitosans in Wasser überschritten.

Tab. 2: Verwendete Chitosane und deren Charakteristika

Chitosan /Derivat	Deacetylierungsgrad	Viskosität (mPas; 1%, 20°C)
Chitosan	75	200
	85	200
	90	20; 100; 500
	95	200
Chitosanlactat	90,7	350
Carboxymethylchitosan	90,1	24

Aufgrund des gegensätzlich geladenen Charakters von Chitosan und Alginat bot sich die Kombination der beiden Polymere an. Zur Untersuchung standen hier sowohl der schichtweise Aufbau durch die beiden Polymere als auch Herstellung mit gegenseitigem Crosslinking der Polymere. Mit Chitosan ummantelte Alginatkugeln wiesen hierbei eine geringere Stabilität (Auflösung nach 30 h in Tris-Puffer) auf als durch Mischung von Chitosan und Alginat hergestellte Kugeln (mindestens 60 h stabil).

Mit dem Ziel, die Stabilität der Chitosanmatrix zu optimieren, wurde die Hüllstruktur durch Biomineralisation verstärkt. Dazu wurden mittels Dualcrosslinking biomineralisierte Polysaccharidkapseln aus Alginat und Chitosan hergestellt, indem eine Alginat-Natriumpentaphosphatlösung (2% Alginat, 1% Natriumpentaphosphat) in ein Gemisch aus Chitosan (1%) und Calciumchlorid (50 mM) getropft wurde. Mit diesem Verfahren entstanden Alginatbeads mit einer aufgewachsenen Chitosanhülle (Abb. 8), bei denen das entstandene Calciumphosphat für eine Stabilisierung der Matrix sorgt. Dieser Aufbau eignet sich zur räumlich getrennten Immobilisierung unterschiedlicher Zelltypen wie Sensor- und Aktorzellen in verschiedenen Kompartimenten.

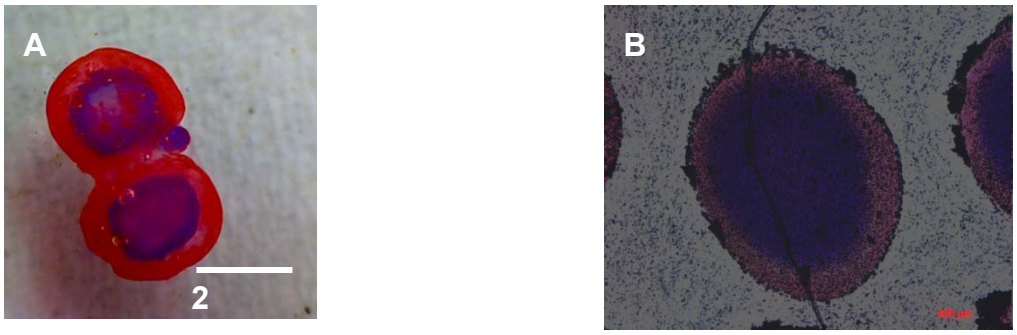


Abb. 8: A Mit Eosin gefärbte Chitosanhülle, B geplotteter Bead, über den eine Chitosanhülle gewachsen ist (2% Alginat mit 1% polyPO_4 und 1% Chitosan mit 30 mM $CaCl_2$)

Kapseln aus reinem Chitosan wurden durch den Zusatz von Chitosanase (aus *Streptomyces spec*. N174) vollständig aufgelöst.

Bei Kompositkapseln aus Alginat und Chitosan führte der enzymatische Verdau zu einer Erhöhung der Permeabilität der Gesamtmatrix, ohne dass die Kugeln gänzlich lysiert wurden. Je nach prozentualer Zusammensetzung der Kompositkapseln könnte somit die Freisetzungsrate variiert werden. Es zeigte sich weiterhin, dass die Vitalität der eingebetteten Zellen (Anwachsen der Zellen aus der Matrix heraus) maßgeblich vom Deacetylierungsgrad des verwendeten Chitosans abhängig ist. Durch die Herabsetzung der Vitalität bei Deacetylierungsgraden im Bereich 90-95% lässt sich die Schaltung der Aktorzellen verzögern, während Chitosanmatrices mit Deacetylierungsgraden mit 75% einen nur geringen inhibitorischen Einfluss auf die Zellen ausüben.

1.2.2 Entwicklung von pH-sensitiven Hüllstrukturen (A 2-2)

Ziel dieser Arbeiten war es, ein Verfahren zu entwickeln, bei dem Aktor-Hefezellen in eine pH-sensitive Matrix eingebettet werden. Dabei galt es, eine Hülle zu entwickeln, die im neutralen pH-Bereich, d. h. im nicht aktivierten Zustand des Aktors, stabil ist, während sie im sauren pH-Bereich zunehmend instabil werden soll. Die Schaltung soll hierbei intrinsisch durch Ansäuerung des Mediums durch die Sensor-Hefezellen erfolgen. Der Aufbau solcher Hüllstrukturen wurde durch den schichtweisen Aufbau von so genannten Symplexen verwirklicht. Die wechselweise Beschichtung mit Polyanionen und Polykationen durch die Layer-by-Layer-Technik basiert auf einem Beschichtungsverfahren, bei dem sich aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen geladene Polyelektrolyte auf einer entgegengesetzt geladenen Oberfläche assemblieren und somit einen Schichtaufbau gewährleisten. Tab. 3 zeigt eine Übersicht der im Rahmen des Forschungsvorhabens verwendeten Polyelektrolyte.

Für die Erzeugung pH-responsiver Hüllstrukturen wurde zum einen die Strategie einer Einzelzellummantelung, zum anderen die Beschichtung einer Kernmatrix mit eingebetteten Hefezellen verfolgt. Eine besondere Bedeutung hinsichtlich Schaltung, Stabilität und Vitalität der ummantelten Zellen kommt der Stärke der Polyelektrolyte zu. So wurde bei der Ummantelung einzelner Hefezellen zunächst der Einfluss unterschiedlich starker Polyelektrolyte auf die Beschichtungseffizienz und Vitalität der Zellen untersucht. Je stärker die Polyelektrolyte waren, desto intakter war die Hülle, aber desto geringer fiel der Anteil der überlebenden Zellen aus (vgl. Abb. 3). Allerdings war es notwendig, mindestens einen schwachen Polyelektrolyten für den Aufbau der Symplexschicht zu verwenden, da nur bei schwachen Polyelektrolyten der Dissoziationsgrad vom pH-Wert der Lösung abhängig ist.

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Polyelektrolyte

	Polykation	**Polyanion**
stark	Poly-Diallyldimethyl-Ammoniumchlorid (PDADMAC)	Natrium-Polystyrol-sulfonsäure (PSS)
	Fixacol 159	Polyvinylphosphonsäure (PVPA)
schwach	Polyallylamin-Hydrochlorid (PAH)	Alginsäure
	Polyethylenimin (PE)	Polyacrylsäure (PAA)
	Chitosan	Dextransulfat

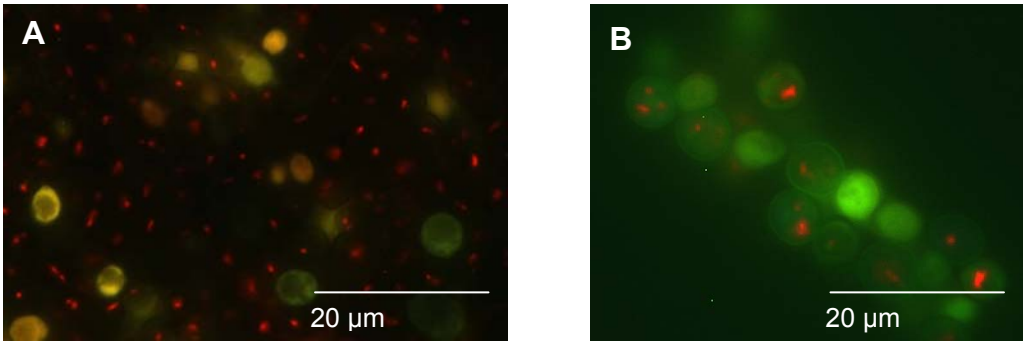


Abb. 9: Lebendfärbung von *S. cerevisiae* BY4741 mit FUN (lebend= rote Färbung von intravakuolären Strukturen) nach Polyelektrolytbeschichtung, letzter Layer FITC-fluoreszenzmarkiert (grün). A Layer-by-Layer-Beschichtung mit $(\text{Chitosan/Dextransulfat})_3$, B $(\text{Polyallylaminhydrochlorid/Polyacrylsäure})_3$

Die Beschichtung einzelner Hefezellen mit Polyelektrolyten bildet auch die Grundlage für weitere Funktionalisierungen (vgl. Modul Aktor). Mit dem Ziel, die Zellen in eine feste Silikatkapsel einzuschließen, konnten erfolgreich SiO_2-Nanosole auf der äußeren kationischen Schicht abgelegt werden. Allerdings reichten diese Zwangsbedingungen auf die Zelle nicht aus, die Zellteilung zu unterbinden. Ummantelte Zellen zeigten das gleiche Wachstumsverhalten wie native Zellen.

Die pH-bedingte Schaltung wurde mittels der Diffusion von fluoreszenzmarkiertem Dextran an beschichteten Alginatkugeln überprüft. Hier ließ sich eine Erhöhung der Permeabilität für 70 kDa große Dextranmoleküle bei einem Schichtaufbau mit dem Polyelektrolytenpaar Polyallylamin-Hydrochlorid/Polystyrensulfonsäure von saurem zu neutralem pH-Wert und eine umgekehrte Schaltung (höhere Durchlässigkeit im Sauren) bei dem Polyelektrolytenpaar Polyethylenimin/Carboxymethylcellulose nachweisen (Abb. 10).

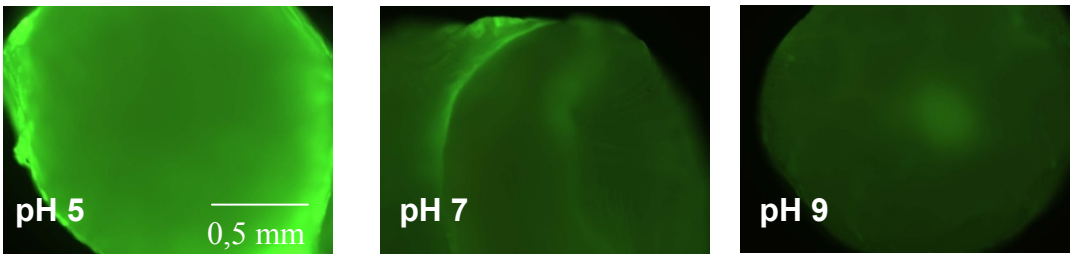


Abb. 10: Alginatkugeln beschichtet mit Polyethylenimin/Carboxymethylcellulose, vorliegend in Lösungen unterschiedlichen pH-Wertes und Inkubation mit 0,2% FITC-Dextran

1.2 Modul Aktor (A 3)

1.3.1 Einbettung von Aktorzellen in bioresponsive Hüllstrukturen (A 3-1)

Die Freisetzung des Enzyms von Sensorhefezellen, das zu einer Permeabilisierung der Hüllstruktur führen soll, erfordert eine Immobilisierung der Sensorzellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Aktorhüllstrukturen. Zur gezielten Anordnung Hefezellen wurde u. a. die Methode des µ-Contactprinting verfolgt. Hierzu wurde der im Rahmen des Projektes von der Firma GeSim bezogene µ-Kontaktprinter in Betrieb genommen. Dieses Gerät ermöglicht zweidimensionale Mikrodrucke von Molekülen auf planaren Substraten. Es stehen zwei unterschiedliche Geometrien zur Verfügung, mit denen Schichtstrukturen für eine gesteuerte Anordnung der Aktormoleküle gestempelt werden können (Abb.11).
Für das Abformen der Stempel werden in Silizium geätzte Masterstrukturen verwendet.

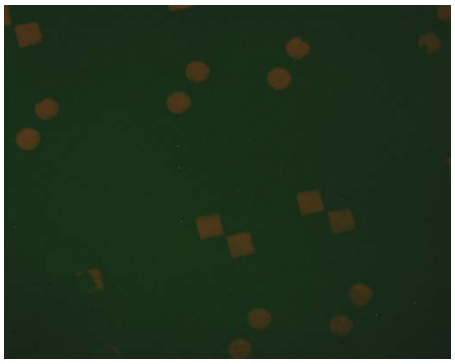


Abb. 11: µ-Contact-Print von Rhodamin auf einem Objektträger (Einzelstrukturen können eine Kantenlänge von 50 µm oder 200 µm besitzen)

Zur Verbesserung der Zelladhäsion an den Glasträger sollte die Streptavidin-Biotin-Bindung genutzt werden. Hierzu wurden zunächst mit Polyelektrolytschichten funktionalisierte (vgl. A 2-2) Zellen biotinyliert. Die Funktionalisierung des Glasträgers erfolgte mittels Aminosilanisierung und konsekutiver Biotinylierung. Streptavidin wurde auf die biotinylierte Schicht durch Stempeln mit einem hydrophilisierten Polydimethylsiloxan-Stempel aufgebracht (Abb. 12). Die Anbindung der funktionalisierten Hefezellen erfolgte somit nur an den zuvor gestempelten Strukturen (Abb. 13).

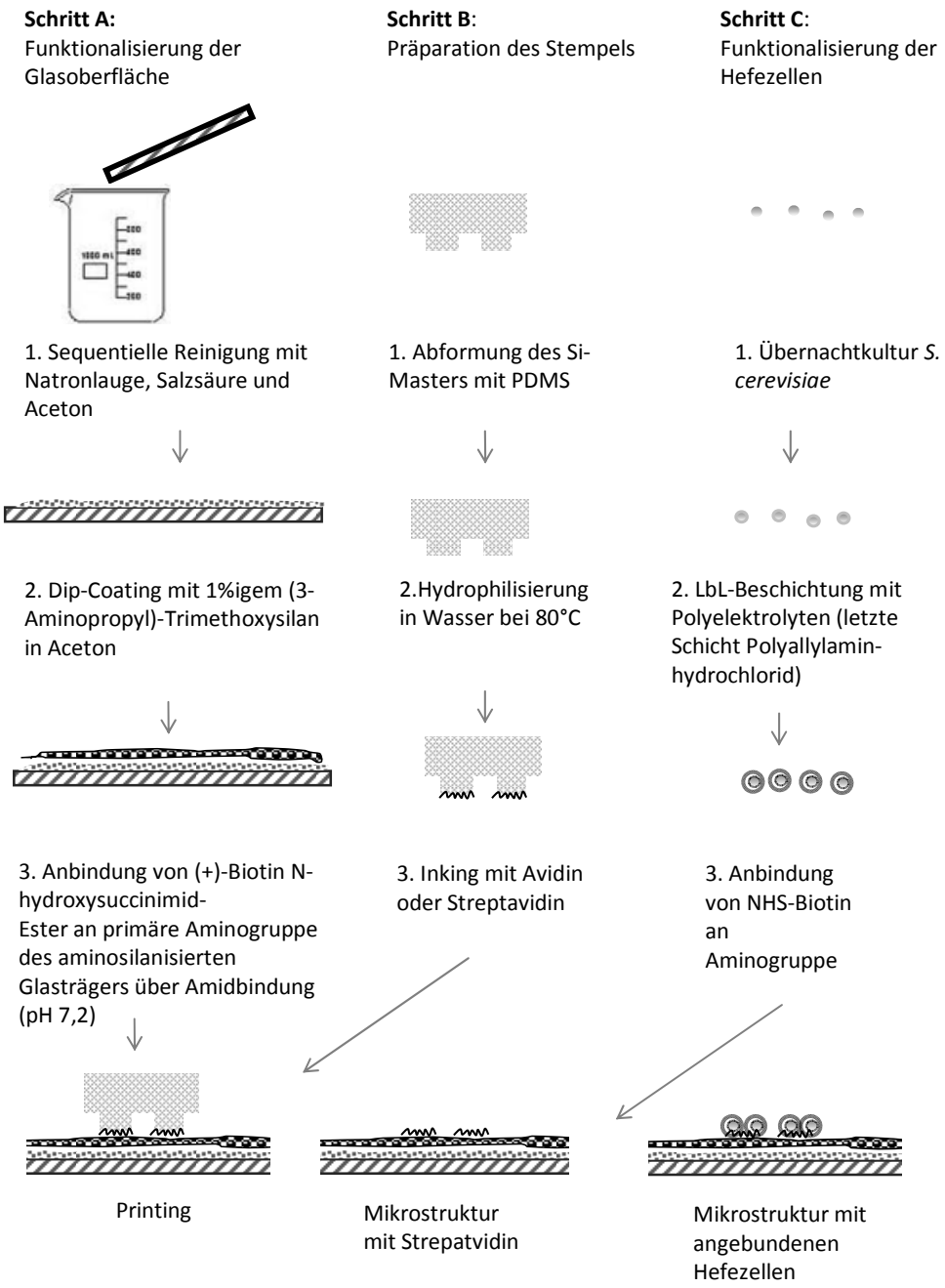


Abb. 12: Schematische Darstellung der Biotin-Streptavidin vermittelten ortsfesten Verankerung von Hefezellen auf planaren Trägern mittels µ-Kontaktdruck

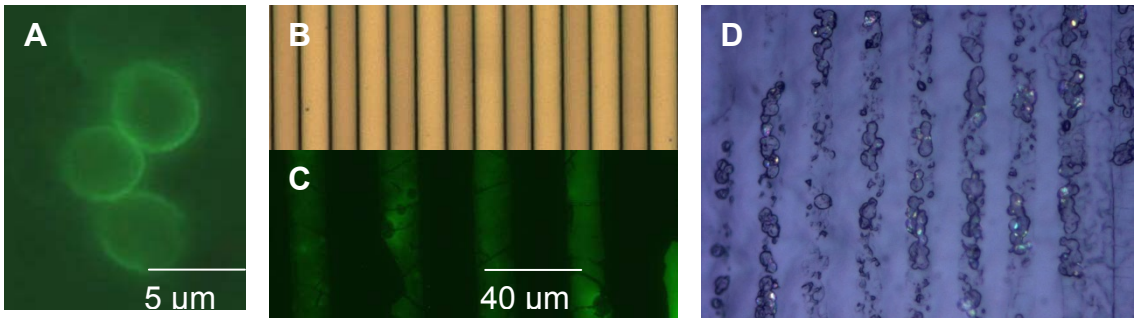


Abb. 13: A mit Polyelektrolyten und Biotin beschichtete Hefezellen, äußere Schicht markiert mit FITC-Streptavidin, B PDMS-Stempelstruktur, C µ-Kontaktdruck von FITC-Streptavidin auf biotinyliertem Objektträger, D auf der gestempelten Struktur angebundene und mit Alginat beschichtete Zellen

Zur korrekten Übertragung der Stempelstrukturen mussten die Druckparameter zuvor optimiert werden. Bei unzureichender Druckhöhe wird das Streptavidin nicht vollständig übertragen, während es bei zu hohem Druck zu Musterdeformierungen kommt (Abb. 14).

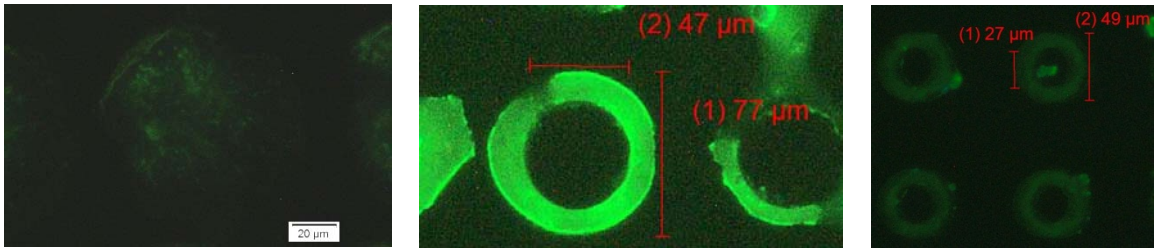


Abb. 14: Druck einer 50 µm großen Doughnut-Struktur mit FITC-gelabeltem Streptavidin auf biotinyliertem Substrat. (links) 0,7 cm höher als optimale Druckhöhe, (Mitte) 0,2 cm tiefer als optimale Druckhöhe, (rechts) optimale Druckhöhe

1.3.2 Einbettung von Aktormolekülen in bioresponsive Hüllstrukturen (A 3-2)

Zur Herstelllung eines auch für kleinere Moleküle undurchlässigen Systems wurde ein im Neutralen wasserunlösliches Polymethacrylat mit kationischen funktionellen Gruppen (Eudragit E), welches unter pH 5 wasserlöslich ist, verwendet. Da man bei der Herstellung von Eudragitverkapselungen auf die Verwendung von organischen Lösungsmitteln angewiesen ist, eignet sich diese Methode statt für Aktorzellen für Aktormoleküle wie Antibiotika (vgl. A 4-4 Demonstrator „Quorum-sensing basierte Überwachung von Wässern“). Hierzu wurde Gentamycinsulfat in Eudragit E eingebettet und die Freisetzung des Antibiotikums in Abhängigkeit vom pH-Wert in einem Hemmhoftest mit *Bacillus subtilis* untersucht (Abb. 15). Hierbei zeigte sich die Auflösung des Eudragits bereits bei pH 6. Die Hemmung des Bakterienwachstums war sowohl durch das freigesetzte Antibiotikum als auch durch das gelöste Eudragit erkennbar.

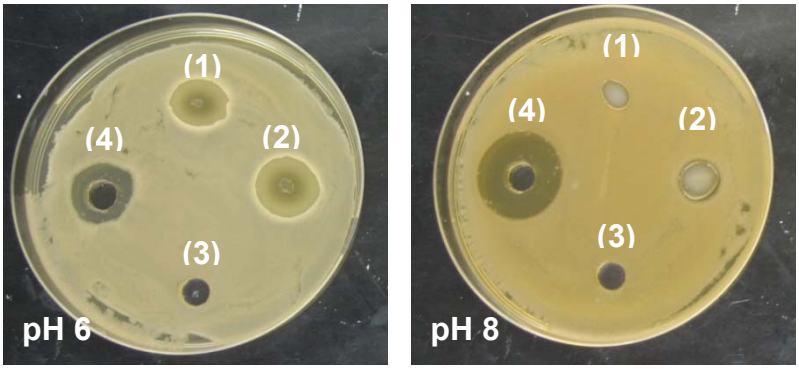


Abb. 15: Hemmhöfe in einem *B. subtilis*-Rasen bei der Freisetzung von Gentamicinsulfat aus Eudragit E bei pH 6 und pH 8. (1) Eudragit, (2) Gentamycinsulfat in Eudragit, (3) H_2O, (4) Gentamycinsulfat

1.4 Demonstratoren (A 4)

Die einzelnen Module Sensor, Schalter und Aktor sollten für die jeweiligen Demonstratoren angepasst und zusammengeführt werden.

1.4.1 Selbst aktivierender Filter für chemische Schad- und Arzneistoffe (A 4-1)

In ersten Untersuchungen zum Demonstrator „Selbst aktivierender Filter für Arzneistoffe“ sollte sichergestellt werden, dass die Zellen in der Immobilisierungsmatrix für den Analyten zugänglich sind. Der bereits ein Arzneistoff-Reporterkonstrukt enthaltende Hefestamm („pdr5“-Stamm, vgl. IfG) wurde vergleichend in Medium und Alginat mit unterschiedlichen Konzentrationen Diclofenac induziert und die Intensität des Fluoreszenzsignals aufgezeichnet (Abb. 16, 17). Während bei der Kontrolle ohne Diclofenac nur eine geringfügige Zunahme der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen war, ließ sich die Expression von turboGFP am besten bei einer Diclofenac-Konzentration von 0,1 mM induzieren. Dies traf auf in Medium und Alginat inkubierte Zellen gleichermaßen zu, was die Zugänglichkeit und Induzierbarkeit in dieser Immobilisierungsmatrix belegt. Zellen in Chitosan als Immobilisierungsmatrix konnten hingegen nicht induziert werden, welches die Anforderung an die Aktormatrix erfüllt.

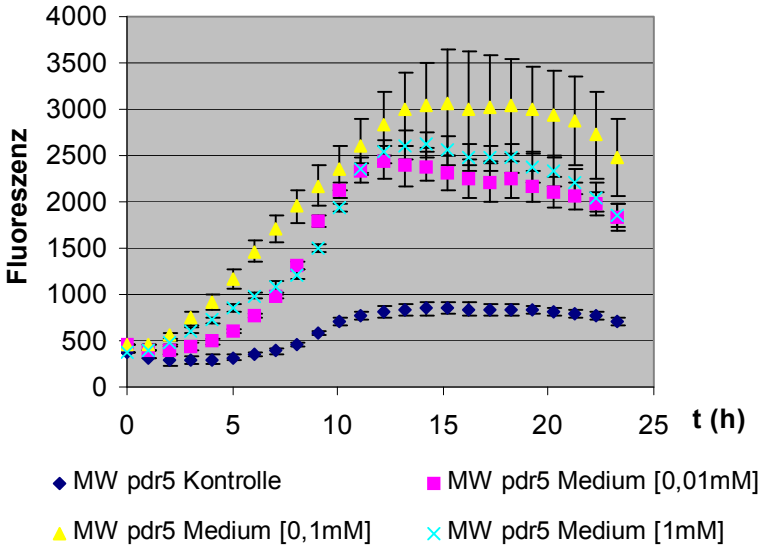


Abb. 16: Ansprechverhalten der Sensorhefe: Induktion von Schadstoff-Reporterkonstrukten enthaltenen Hefen (PDR5) im flüssigen Medium durch Diclofenac

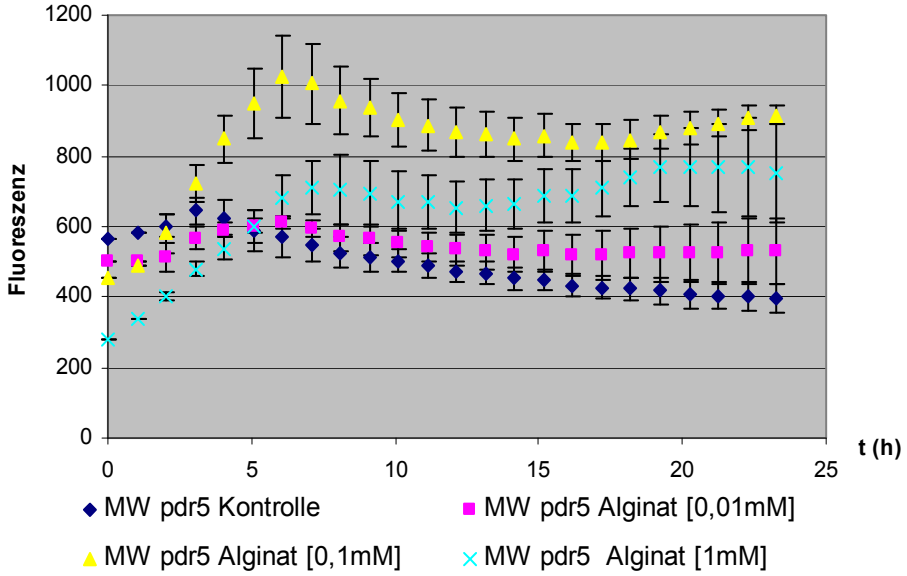


Abb. 17: Ansprechverhalten der Sensorhefe in Alginat**:** Induktion von Schadstoff-Reporterkonstrukten enthaltenen Hefen (PDR5) in Alginat durch Diclofenac

Da bei diesem Demonstrator zum Abbau der Arzneistoffe ganze Zellen im Aktormodul eingebettet und bei Schaltung freigesetzt werden sollen, musste zur Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit der Zellen auf eine hohe Biokompatibilität der Hüllstruktur geachtet werden, die nach den vorangegangenen Untersuchungen am besten bei den enzymatisch abbaubaren Hüllstrukturen gegeben ist.

Für die Aktorhüllstruktur standen somit entweder auf Cellulose (GMBU e.V.) oder Chitosan (IfWW) basierende Hüllstrukturen zur Auswahl.

- Enzymatische Spaltung von auf Cellulose-basierenden Hüllstrukturen mittels rekombinanter Hefen

Aus der Gruppe der Enzyme, die maßgeblich an der enzymatischen Spaltung von Cellulose beteiligt sind, wurden drei verschiedene Endoglukanasen (EG I, EG III und EG V) ausgewählt und die entsprechenden Gene in rekombinante Hefen eingebracht. Die vom IfG erzeugten gentechnisch modifizierten Hefen können diese Enzyme konstitutiv exprimieren. Es wurde untersucht, inwiefern diese Enzyme in der Lage sind, die entwickelten Hüllstrukturen enzymatisch zu spalten. Dafür wurden jeweils frisch transformierte Zellen verwendet. Als Negativkontrolle wurden Wildtypzellen getestet. Die Zellen wurden entweder direkt in die Cellulosematrix mit eingebettet oder aber als freie Zellen zugegeben. Die Proben wurden anschließend bei 30°C im Nährmedium kultiviert und der Abbau der Cellulosematrizen beobachtet.

Es zeigte sich, dass analog zu den Versuchen mit dem kommerziell erhältlichen Enzymgemisch Cellulase Onozuka R-10 die Kompositmaterialien, bestehend aus reinen Cellulosederivaten, tendenziell leichter abgebaut wurden als Cellulase/Silika-Kompositmaterialien. Allerdings dauert der Abbau im Vergleich zu dem Enzym-gemisch deutlich länger, was darauf zurückzuführen ist, dass die Enzyme in den rekombinanten Hefen erst gebildet und anschließend in das Umgebungsmedium abgegeben werden müssen. Eigene Versuche sowie auch Versuche am IfG (Cellulase-Diffusionstest auf CMC-Agarplatten und anschließender Kongorot-färbung) haben gezeigt, dass es bei den einzelnen Stämmen Unterschiede in der sekretierten Menge und der Enzymaktivität gibt. Der Stamm MFα matEGIII z.B. gibt die höchste Enzymmenge an das Medium ab. Allerdings zeigten auch hier Versuche mit dem Zelllysat, dass der Großteil der produzierten Enzymmenge noch in den Zellen verbleibt. Durch eine Steigerung der Effizienz der Enzymsekretion könnte die Geschwindigkeit der enzymatischen Schaltung der Hüllstrukturen somit erhöht werden.

Auf Glasträgern fixierte Spots aus den Cellulosederivaten CMC und Celquat SC240C lösten sich in Anwesenheit der EGIII und EGV exprimierenden Zellen innerhalb von 1-2 Tagen komplett auf. Beim EG I exprimierenden Stamm – aber auch beim Wildtypstamm – befanden sich nach zwei Tagen Inkubation noch Spot-Reste auf dem Objektträger bzw. im Medium. Im Gegensatz dazu blieb die Kontrolle im zellfreien Medium stabil, so dass die Auflösung der Spots durch den Wildtypstamm vermutlich auf die Absenkung des pH-Wertes aufgrund des Zellwachstums zurückgeführt werden kann.

Im Gegensatz zu den rein auf Cellulosederivaten basierenden Matrices war der Abbau von Celquat/Silika-Kompositmaterialien wie bereits erwähnt etwas lang-samer, aber hier blieb die Negativkontrolle mit dem Wildtypstamm auch nach sieben Tagen Inkubation stabil (siehe Abb. 18). Dagegen quollen in den Proben mit dem EG I und EG V exprimierenden Stämmen die Kugeln stark auf und erwiesen sich als sehr weich und instabil. Bei dem EG III exprimierenden Stamm waren sogar nur noch Hüllreste der einstigen Kugeln vorhanden.

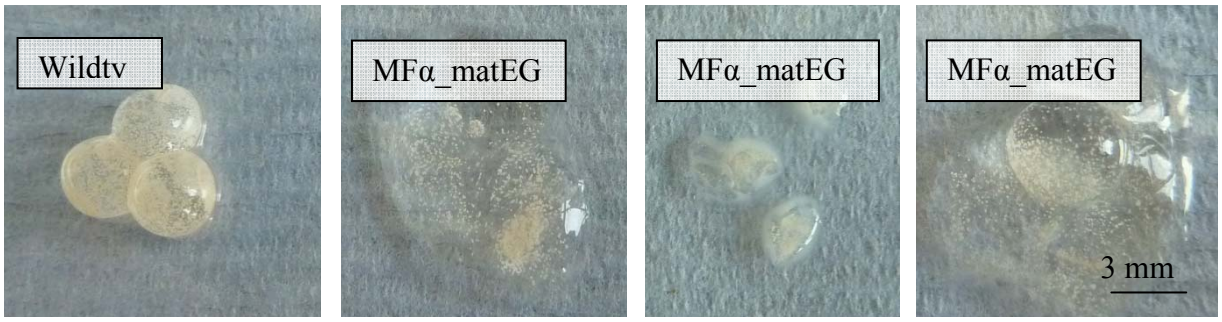


Abbildung 18: Untersuchung der enzymatischen Spaltbarkeit von Kugeln aus Celquat SC240C/Silika mittels Endoglukanasen (EG I, EG III oder EG V) produzierender rekombinanter Hefezellen, fotografiert nach sieben Tagen Inkubation bei 30°C in Nährmedium. Immobilisierte Wildtypzellen dienten als Negativkontrolle (AP317).

Diese Versuche zeigen somit, dass sowohl bei der Wahl der Hüllstruktur als auch bei der Wahl des zu exprimierenden Enzymes bezüglich dessen Sekretionsmenge/-geschwindigkeit ins Medium die Geschwindigkeit der enzymatischen Spaltung der Hüllstruktur beeinflusst werden kann. Hüllstrukturen auf Basis reiner Cellulose-derivate werden schneller abgebaut als Cellulose/Silika-Kompositmaterialien. Zudem wurde in Anwesenheit des EG III exprimierenden Stammes im Vergleich zu den anderen beiden rekombinanten Stämmen ein deutlich schnelleres Abbauverhalten der Hüllstrukturen beobachtet.

- Enzymatische Spaltung von auf Chitosan-basierenden Hüllstrukturen mittels rekombinanter Hefen

Vom IfG wurden zunächst Hefestämme hergestellt, welche die zuvor als zellfreies Enzym verwendete Chitosanase aus *Streptomyces* spec. N174 konstitutiv exprimierten. Nach dem erfolgreichen Abbau unterschiedlich deacetylierter Chitosane erforderte der nächste Schritt die Kombination von Sensor- und Schaltermodul in einer Hefe. Zu diesem Zweck wurde die Expression der Chitosanase unter die Kontrolle des *pdr5* Promotors gestellt. Der Chitosanabbau erfolgte einerseits in einer Flüssigkultur des mit 1 mM Diclofenac induzierten rekombinanten Stammes, andererseits eingebettet in die Chitosanmatrix. Die Proben wurden jeweils bei 30°C im Nährmedium inkubiert und der Abbau der Chitosankugeln im Zeitverlauf beobachtet.

Wie aus Abb. 19 ersichtlich, erfolgte die vollständige Lyse der reinen Chitosanmatrices in Flüssigkultur innerhalb von 24 h, während die Chitosankugeln in einer Kultur des Wildtypstammes stabil blieben.

Abb. 19: Chitosandegradation: Chitosan in zwei unterschiedlichen Deacetylierungsgraden (75 vs 95%), 2% Chitosan in 1 % Essigsäure, Crosslinking in 1% TPP**,** Kugeln nach 24 h, geschüttelt 120 rpm, links Wildtyp, rechts Chitosanaseexpression unter dem *pdr5* Promotor.

In Abb. 20 ist der Abbau des Chitosans durch direkt in Chitosan eingebettete und danach induzierte Hefen dargestellt. Der Abbau ist gegenüber dem vorherigen Versuch zeitlich stark

verzögert. Nach 24h war in keiner Variante (ausgenommen Chitosanderivate) eine beginnende Lyse der Immobilisierungsmatrix zu verzeichnen. Nach 3 Tagen waren die Chitosankugeln vollständig durch die rekombinanten Hefezellen abgebaut. Trotz der anfänglichen metabolischen Inaktivität bewahrten die Zellen ihre Lebensfähigkeit und aktorische Funktion.

Abb. 20: Degradation der Aktorhüllstruktur durch in Chitosan eingebettete, Chitosanase exprimierende Hefen (obere Reihe), nicht modifizierte Hefen (untere Reihe) Kugeln nach drei Tagen, geschüttelt bei 120 rpm; Chitosanlactat, Chitosan 85/200, Chitosan 90/500, Chitosan 95/200 (von links nach rechts; mit Angaben zu Deacetylierungsgrad in % / Viskosität in mPa einer 1%igen Lösung in 1% Essigsäure).

1.2 A 4-2: Selbst-regulierende Zelladsorption zur Rückgewinnung von Metallionen

1.2.1 Mikrostrukturierte Schichten

Unter dem Arbeitspunkt „Sensorische Schichten auf planaren Trägern“ wurde ein Konzept weiter bearbeitet, dessen Grundlagen bereits im SAP-geförderten Projekt PolyInspect (FZ 13083/2205) gelegt wurden. Biosensoren auf der Basis immobilisierter lebender Zellen setzen im Fall quorum-sensing-basierter Systeme hinreichend kurze Diffusionswege voraus. Diese können auf einfachem Weg durch eine Vorstrukturierung von Sol-Gel-Matrizen mit hier so genannten „Opferhefen“ gewährleistet werden. Zellen von *S. cerevisiae* besitzen die intrinsische Eigenschaft, sich zu hexagonalen Zellverbänden zusammenzulagern. Mischt man eine Zellsuspension mit einem siliziumhaltigen Nanosol (bspw. TEOS), lassen sich per dip-coating auf Glasträgern dünne Schichten erzeugen, in denen die Hefezellen unter Ausbildung definierter Silicagel-Stege von ca. 1 µm Dicke dicht beieinander liegen (Abb. 21).

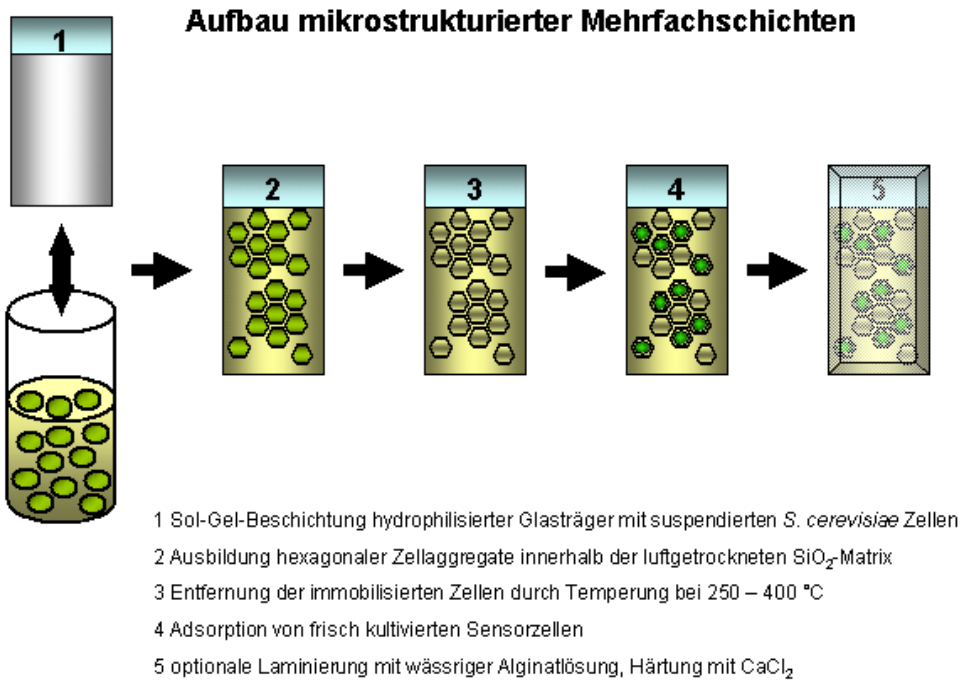


Abb. 21: Schematische Darstellung der Erzeugung von Mikrokavitäten in planaren Gelschichten

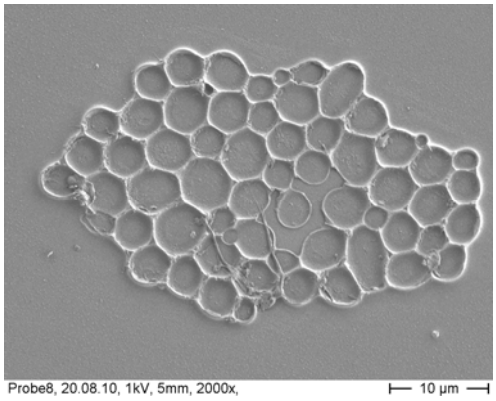


Abb.22: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Mikrokavitäten in dünnen TEOS-Schichten, erzeugt durch kommerzielle Bäckerhefe, getempert bei 400 °C.

Die mit Hefezellen vorstrukturierten Schichten werden, in der Luft hängend, getrocknet und die „Opferhefen“ anschließend bei 250 bis 400 °C durch Temperung entfernt. Es entstehen auf diese Weise regulär angeordnete Mikrokavitäten, die durch einfache Adsorption mit frisch kultivierten Sensorhefen belegt werden können (Abb. 22).

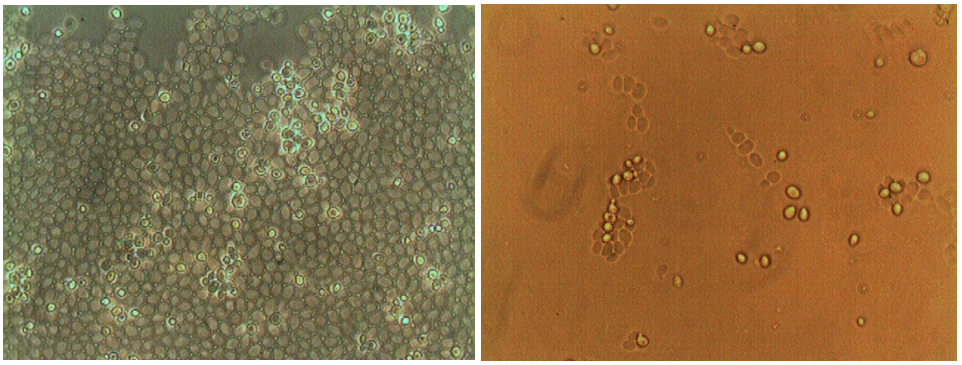


Abb.23: Adhärierte Zellen von *S. cerevisiae* BY 4741 auf vorstrukturierter, getemperter SiO_2-Schicht, mit 5 % Glyzerin vorbehandelte (links), unbehandelte Schicht (rechts).

Die so vorstrukturierten Schichten konnten bis zu einem Bedeckungsgrad von ca. 40 % der angebotenen Kavitäten mit frischen Hefezellen aufgefüllt werden (Abb. 23). Die Schichten lassen sich auch mit 1%iger Alginatlösung bedecken, welche anschließend mit 120 mM $CaCl_2$ 30 Minuten lang ausgehärtet wird. Die eingebetteten Zellen wurden nach 48 Stunden (Lagerung bei 6°C) durch Anfärben mit 4 µM Calcein Acetoxymethylester auf ihre Esteraseaktivität hin untersucht und mikroskopiert (Aufnahme M. Maitz, Abb. 24). Aus der Literatur ist bekannt, dass verschiedene Polyelektrolytschichten dazu dienen, adsorbierte Bakterien zuverlässig abzutöten bzw. bevorzugt tote Zellen adsorbieren. In entsprechenden eigenen Versuchen mit Hefezellen auf verschiedenen Polyelektrolyten konnten diese Befunde zum Teil bestätigt werden (bspw. mit Polyethylenimin). Unter dem Aspekt der Erhaltung der Lebensfähigkeit der Sensor-Aktor-Zellen in planaren Matrices sind diese Elektrolytschichten nicht geeignet. Generell konnte festgestellt werden, dass frisch kultivierte, junge Hefezellkulturen von BY 4741 (10 bis 24 h) eine gering ausgeprägte Tendenz zur Adsorption auf Mikrokavitätenschichten zeigten. Ältere Kulturen (> 2 Tage) tendieren zur Flockung in Suspension und lassen sich auf den Schichten nicht mehr vereinzeln.

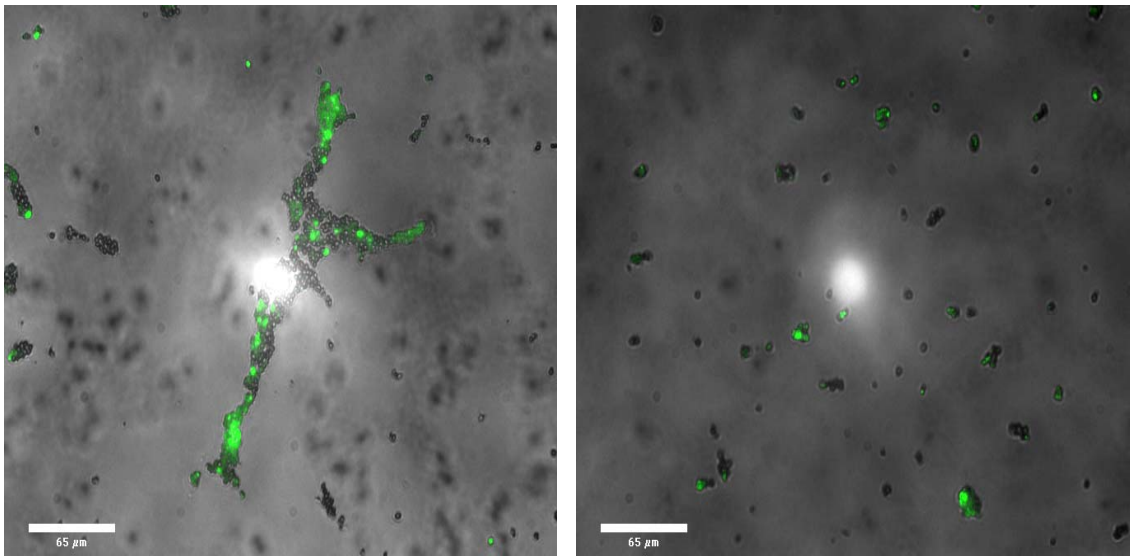
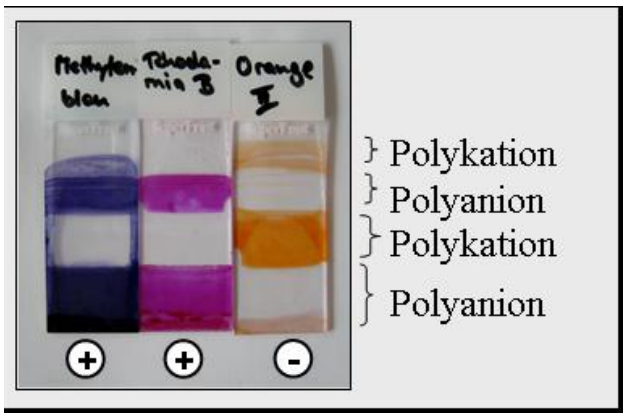


Abb. 24: Esterase-aktive Hefezellen *S. cerevisiae* BY 4741 in einer 1 %igen Alginatschicht mit vorstrukturierten Mikrokavitäten in SiO_2-Gel. Kombinationsbild Fluoreszenz-Durchlicht.

Vom IfG wurden Hefezellen mit anionischen Bindungsmotiven auf der Zellwand generiert, die über eine erhöhte Kupfer-Aufnahme verfügen. Um deren Adsorptionsfähigkeit auf planaren Trägern zu untersuchen, wurden verschiedene Polyelektrolyte auf Objektträgern aufgebracht, der Belegungsgrad überprüft (Abb. 25 und 26) und schließlich die Adsorptionsfähigkeit der Hefen an frischen Zellsuspensionen getestet.

Abb. 25: Nachweis der Mehrfachbeschichtungen aus (PDADMAC/ PVPA)$_2$ mittels geladener Farbstoffe: Methylenblau (positiv), Rhodamin B (positiv) und Orange II (negativ geladen). Bei jedem Beschichtungsschritt wurde die Eintauchtiefe der Glasobjektträger verringert. Außerdem wurden die Schichten nach jeder Beschichtung 2 h getrocknet (AP165-B).



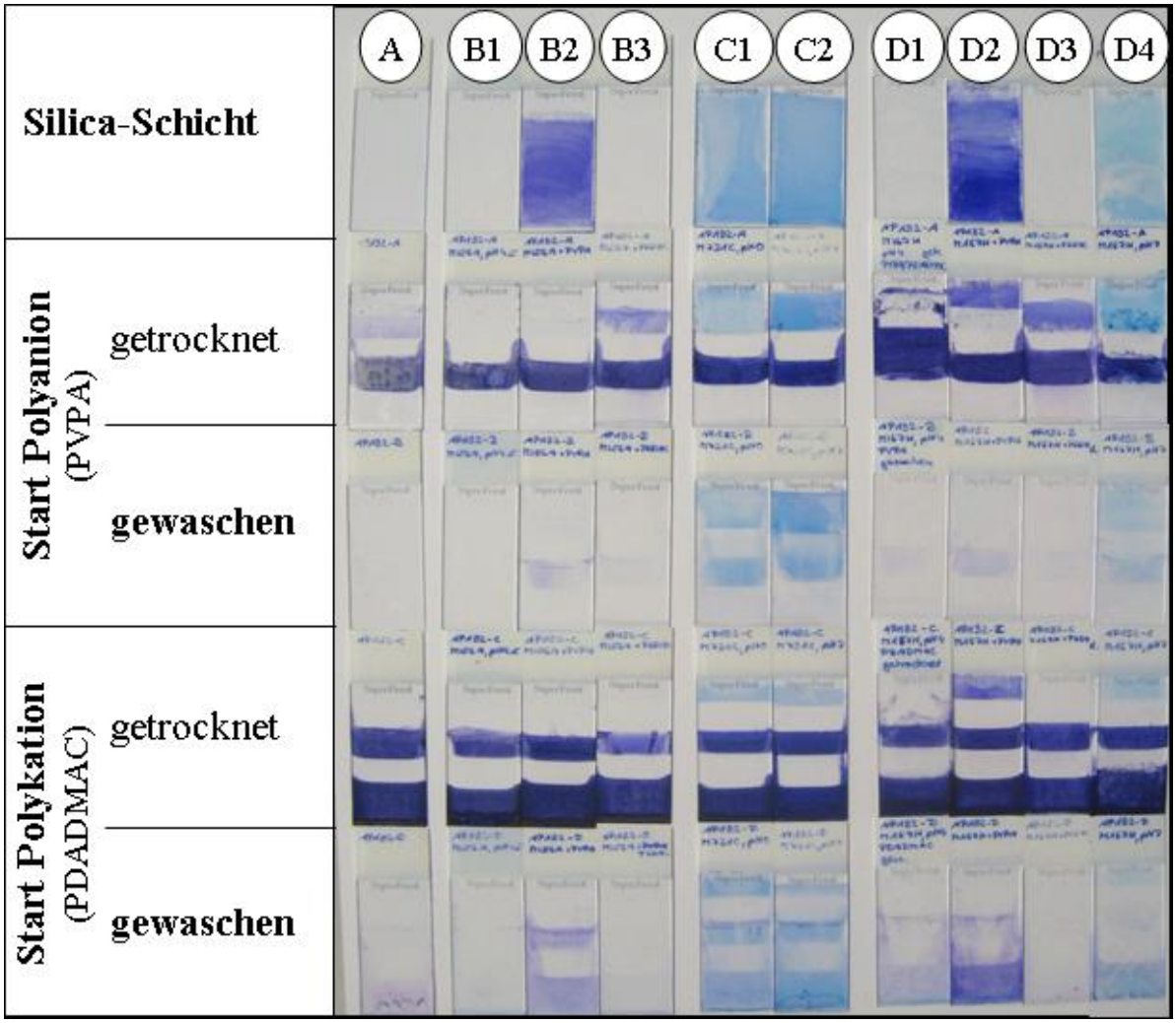


Abb. 26: (PDADMAC/PVPA)$_2$ beschichtete Glasobjektträger mit Silicaschichten als Haftgrund. Vergleich zwischen sofort gewaschenen Schichten und zwischendurch getrockneten Schichten. Anfärbung der Multischichten mittels positiv geladener Methylenblaulösung. (A) Kontrolle, Glasobjektträger ohne Silica-Schicht, (B1) M156A pH unreguliert, (B2) M156A + 0,5% PVPA, (B3) M156A + 0,5% PDADMAC, (C1) M731C pH unreguliert, (C2) M731C pH 7, (D1) M162B pH unreguliert, (D2) M162B+0,5% PVPA, (D3) M162B + 0,5% PDADMAC, (D4) M162B pH 7.

Mit jedem Beschichtungsschritt wurde die Eintauchtiefe in die PE-Lösung verringert. Insgesamt wurden vier Schichten aufgebracht: $(PDADMAC/PVPA)_2$. Nach der letzten Beschichtung wurden die Objektträger mit Methylenblau angefärbt und anschließend gründlich gewaschen.

Es zeigte sich, dass sich die PE-Multischicht auf jedem Haftgrund (auch reiner Glasobjektträger ohne Silicaschicht) ausgebildet hat, wenn die Schichten nach der PE-Beschichtung nicht gewaschen, sondern nur getrocknet wurden. Aus Abb. 26 wird jedoch ersichtlich, dass ein Großteil der zunächst angelagerten Polyelektrolyten durch die Waschschritte abgespült wurde und somit die Objektträger deutlich heller gefärbt sind. Außerdem wird deutlich, dass sich vor allem auf dem reinen Objektträger ohne Haftgrund, aber auch bei der Variante B1 (M156A pH unreguliert), B3 (M156A + 0,5% PDADMAC) und D3 (M162B + 0,5% PDADMAC) vermutlich keine bzw. kaum eine Multischicht ausgebildet hat. Günstig als Haftgrund erwies sich das sulfonierte Sol M731C (C1 und C2) sowie eine Zugabe von 0,5% PVPA zu den Solen (B2 und D2). Auch durch die Neutralisierung der Sole konnte die Ladung der Silicaschicht günstig für die Anlagerung des Polykation PDADMAC gestaltet werden (Silica ist negativ geladen bei pH > 3 bis 4).

Zetapotentialmessungen (Zetasizer 3000, Malvern Instruments) an PDADMAC-Schichten zeigten eine eindeutige Abhängigkeit der Oberflächenladung vom pH-Wert (Abb. 26). Demnach ist die größte positive Ladungsdichte in sauren Bereich zu finden. Bei höheren pH-Werten ist davon auszugehen, dass ein Teil der positiven Ladungen durch OH-Ionen abgesättigt wird und für die Bindung negativ geladener Partikel nicht mehr zur Verfügung steht.

Leider gelang der Nachweis negativer Ladungscluster an genetisch modifizierten Hefezellen mit Hilfe der Zetapotentialmessung nicht. Die experimentellen Daten (nicht dargestellt) legen den Schluss nahe, dass die Zellen durch das Anlegen einer elektrischen Spannung zerstört werden.

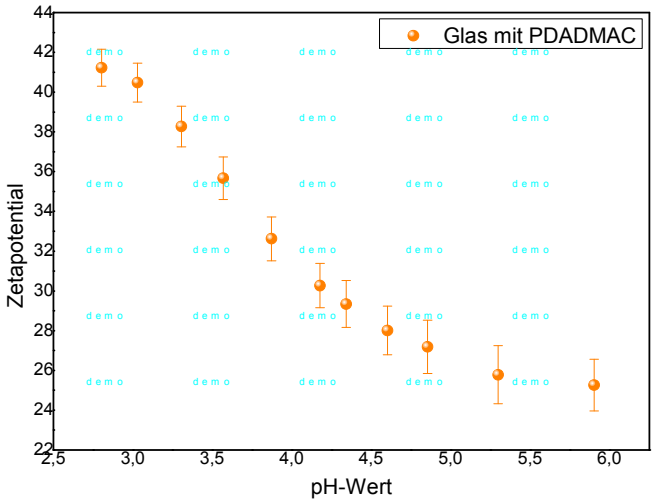
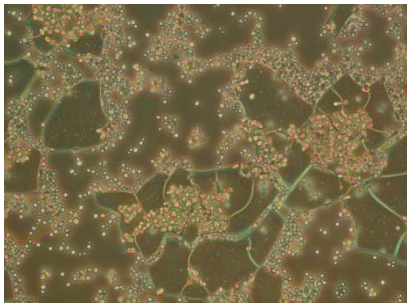


Abb. 26: Zetapotentialmessung (in mV) an PDADMAC beschichteten Glasobjektträgern in Abhängigkeit vom pH-Wert.

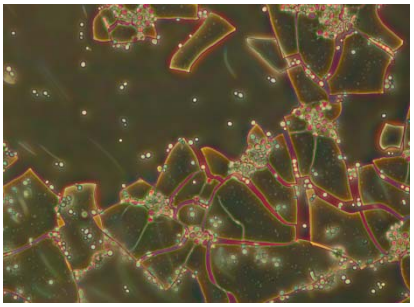
Folgende Beschichtungen wurden daraufhin an frischen Hefesuspensionen ausgetestet:

- Mikrokavitätenschicht mit polyanionischer Beschichtung mit Polysulfonsäure (PSS) und polykationischer Beschichtung mit Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) alternierend
- Objektträger mit Fixacol
- Glasgewebe
- Mikrokavitätenschicht mit Komposit aus Al_2O_3-SiO_2
- Mikrokavitätenschicht mit kationischem Gel AP 307B

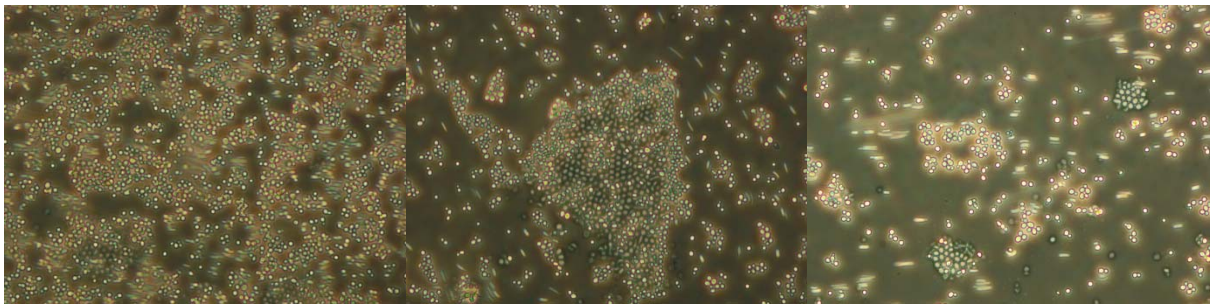
Es stellte sich heraus, dass die Adsorption frisch transformierter Zellen am effektivsten war, wenn die Zellsuspension in Petrischalen direkt auf die Glasobjektträger aufgetropft wurde und dort für ca. 3 Stunden verblieb.



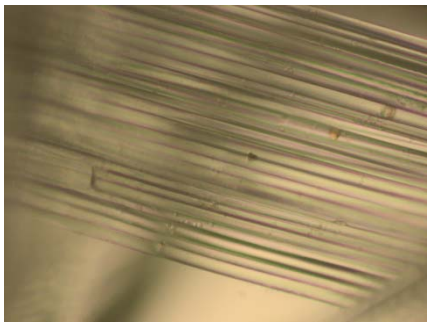
Mikrokavitätenschicht mit Komposit aus Al_2O_3 und SiO_2



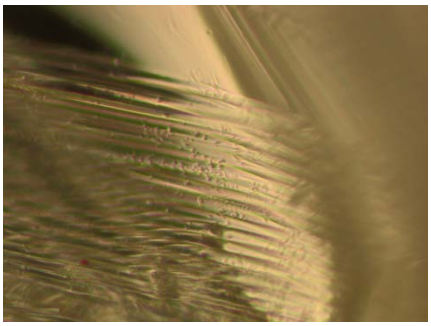
1 x gespült



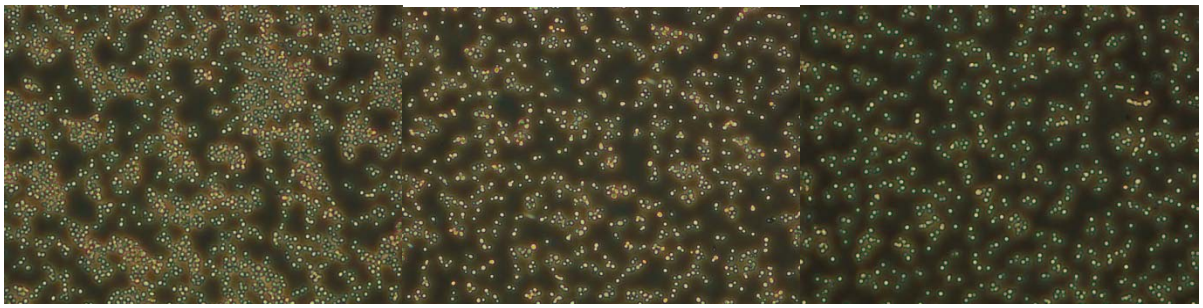
Mikrokavitätenschicht mit kationischem Gel AP 307B | 1 x gespült | 3 x gespült



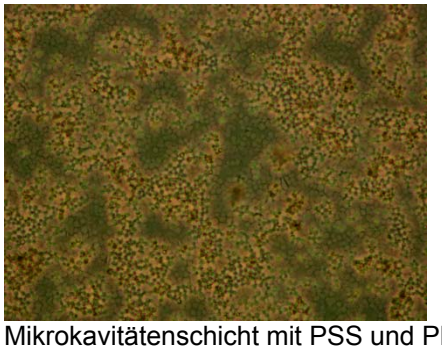
Glasfasergewebe mit PSS und PDADMAC



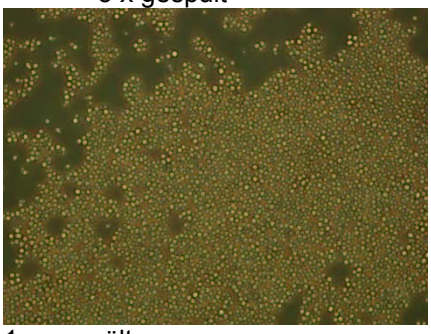
Glasfasergewebe ohne Beschichtung



Fixacol | 1 x gespült | 3 x gespült



Mikrokavitätenschicht mit PSS und PDADMAC



1 x gespült

Abb.27: Lichtmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen planaren Schichten zur Adsorption von genetisch modifizierten Hefezellen mit anionischen Bindungsmotiven auf der Zellwand. Die Zellen wurden 3 Stunden lang auf den Schichten adsorbiert und teilweise mit Wasser gespült.

Es zeigte sich, dass die Sol-Gel-Schichten zum Teil mechanisch nur unzureichend stabil sind und zu Abplatzungen neigen. Auf den Mikrokavitätenschichten, die zusätzlich mit Polyelektrolyten oder modifizierten Gelschichten bedeckt waren, konnte eine erhebliche Anzahl adsorbierter Zellen mikroskopisch detektiert werden. Diese saßen jedoch relativ lose und ließen sich größtenteils mit Wasser abspülen. Die besten Resultate konnten mit Fixacol-

modifizierten Objektträgern erreicht werden. Der größte Teil der adsorbierten Zellen verblieb auch nach dreimaligem intensivem Waschen mit Wasser auf der Objektträgeroberfläche. Auf Polyelektrolyt-beschichtetem Glasgewebe war die Adsorption von Zellen vernachlässigbar (s. dazu Abb.27).

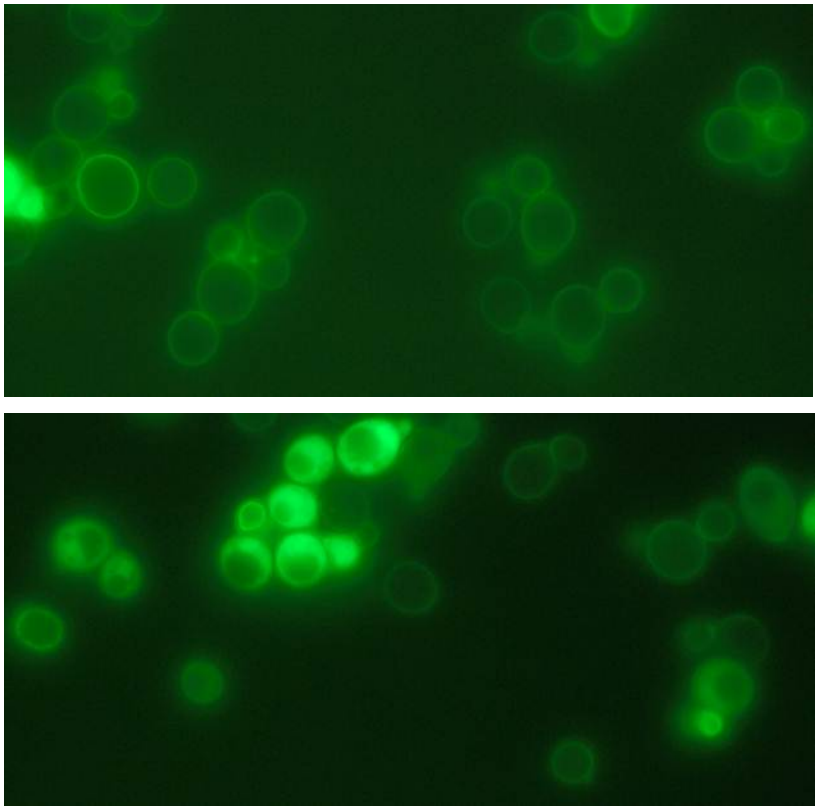


Abb. 28: Nachweis von negativen Ladungsclustern anhand Fluoreszenzfärbung mit FITC-markiertem Polyallylamin, oberes Bild *S. cerevisiae* BY 4741 Wildtyp, unteres Bild rekombinante Hefe mit negativen Ladungsclustern auf der Oberfläche

Das Vorhandensein und die Zugänglichkeit der oberflächigen negativen Ladungscluster konnten durch Anfärbung der Hefezellen mit dem FITC markierten, kationischem Polyelektrolyten Polyallylamin nachgewiesen werden (Abb. 28).

Das Funktionsprinzip des zu entwickelnden Demonstrators sieht vor, dass genetisch veränderte Hefezellen Kupfer vermehrt aufnehmen und im Anschluss daran, vermittelt durch auf der Zellwand exprimierte negative Ladungscluster (aga2p), durch einfache Adsorption an technischen Oberflächen aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden können. Denkbar ist in diesem Zusammenhang, dass kationisches Kupfer in der Lösung direkt an die oberflächigen negativen Ladungscluster bindet und diese dann für eine Entfernung der beladenen Zellen per Adsorption an komplementär geladene Oberflächen nicht mehr zur Verfügung stehen. Um diese Möglichkeit auszuschließen, sollten mit Kupfer beladene Hefen näher untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden dem IfWW rekombinante Hefestämme sowohl mit erhöhtem Kupferaufnahmevermögen als auch mit erhöhtem Aufnahmevermögen für Kupfer, Eisen und Zink sowie entsprechende Referenzstämme zur Verfügung gestellt.

Zur Validierung der massenspektrometrischen Analyse wurden ausgewählte Proben für transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen präpariert. Dazu wurden die Zellsuspensionen mit je 2,5% Glutaraldehydlösung (GA) versetzt und mindestens 24 h quervernetzt. Anschließend wurden die Proben zur Entfernung des GA mit je 500 µl 0,9% NaCl gewaschen und je 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Diese Prozedur wurde wiederholt und das resultierende Pellet mit je 500 µl low melting Agarose vorsichtig gemischt. Die Masse wurde auf Objektträgern ausgestrichen und im Kühlschrank 30 Minuten ausgehärtet. Anschließend wurden aus der Agarose ca. 3 x 8 mm große Streifen geschnitten und in verschließbare Glasviolen überführt. Als nächster Präparationsschritt erfolgte die Entwässerung in Aceton nach dem in Tab. 4 aufgeführten Schema.

Tab. 4: Entwässerungsreihe für die Probenpräparation der Dünnschnittpräparate für die Transmissionselektronenmikroskopie

Schritt	*Wasser*	*Aceton*	*Spurr-Harz*		
1.	1 ml	1 ml 50%		tröpfchenweise innerhalb 30 Minuten	Überstand abziehen
2.		2 ml 50%		jeweils15 Minuten stehen lassen	
3.		2 ml 75%			
4.		2 ml 95%			
5.		3x2 ml wasserfrei		20 min stehen lassen	Harz abziehen
6.		3 Teile wasserfrei	1 Teil	4 h stehen lassen	
7.		1 Teil wasserfrei	1 Teil	ü. N. stehen lassen	
8.		1 Teil wasserfrei	3 Teile	4 h stehen lassen	
9.			Harz pur	4 h stehen lassen	Harz abziehen und erneuern, über Nacht stehen lassen, Harz abziehen

Anschließend wurden die Proben in spezielle, konisch zulaufende Minitubes überführt und mit frischem Harz vorsichtig überschichtet. Die Polymerisierung erfolgte bei 60 °C im Ofen für mindestens 48 h.

Die fertigen Rohlinge wurden anschließend aus den Kunststofftubes heraus-geschnitten, getrimmt und Dünnschnitte angefertigt (Dr. A. Springer, ZTKGW).
Die Visualisierung erfolgte in einem Zeiss Transmissionselektronenmikroskop LIBRA 200 im EELS-Modus (Dr. P. Formanek, N. Haufe, J. Sperling). Problematisch bei der Untersuchung von Hefezellen ist deren rigide Zellwand, die eine quantitative Infiltration mit dem Einbettmedium erschwert. Die Dünnschnittpräparate zeigten teilweise nur unzureichend fixierte Zellschnitte, die leicht aus der Matrix herauszulösen sind (Abb. 29).

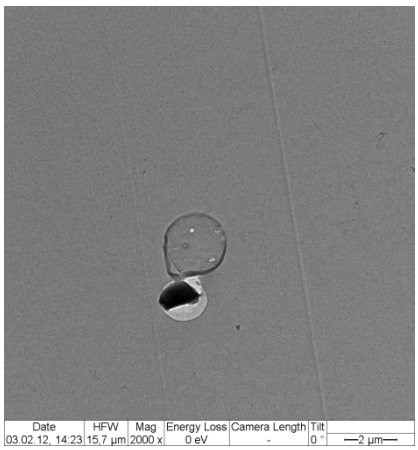


Abb. 29: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Dünnschnittpräparates von mit Kupfer beladenen Hefezellen (Stamm BY 4741 Delta CTR1 p425 GPD::CTR1delta300)

Die Auswertung der EELS-Messungen verschiedener Kupfer-haltiger Hefezellen erbrachte für keine der untersuchten Proben ein positives Ergebnis. Die möglichen Begründungen dafür sind rein spekulativ. Zum einen sind die Probenpräparation und die Untersuchung extrem aufwendig und zeitintensiv, weshalb nur wenige ausgewählte Proben im Zeitrahmen begutachtet werden konnten. Weiterhin sind die Präparate bewusst wenig kontrastiert, um eventuell vorhandenes Kupfer nicht durch kontrastreichere Elemente zu maskieren (Abb. 30). Dafür waren die Zellen im Präparat schwer aufzufinden.

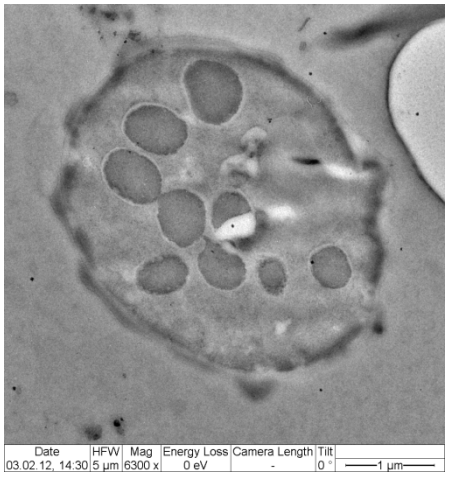


Abb. 30: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Dünnschnittpräparates von mit Kupfer beladenen Hefezellen (Stamm BY 4741 Delta CTR1 p425 GPD::CTR1delta300). Die Proben wurden nicht kontrastiert.

Des Weiteren waren insgesamt vergleichsweise wenig Zellen zu finden, was eine statistische Auswertung der Daten nicht zuließ. Außerdem ist nicht bekannt, welcher Anteil der

transformierten Zellen der gesamten Population in der Lage ist, Kupfer zu akkumulieren. Möglicherweise liegt das Kupfer innerhalb der Zelle zudem diffus verteilt vor, sodass die lokale Konzentration unterhalb des Detektionslimits liegt.

ZE:	Förderkennzeichen:
TU Dresden, FR Chemie und Lebensmittelchemie Professur für Organische Chemie der Polymere (OCP) Prof. Dr. B. Voit	03WKP08

II. 1 Eingehende Darstellung der Ergebnisse

Die Verwendung der finanziellen Zuwendungen erfolgte ordnungsgemäß im Rahmen der vorgegebenen Vorgaben, um die Projektziele entsprechend bearbeiten zu können.

Für den Berichtszeitraum wurde das Modul **A3** „Schalter" im Teilprojekt OCP bearbeitet. Der Schwerpunkt lag v.a. auf adaptierbaren Hydrogelen, die an anorganischen Oberflächen als dünne Schichten bzw. als 3D-Strukturen appliziert werden sollten. Diese Hydrogelschichten sollten zur pH- oder Temperatur-sensitiven Enzymverkapselung und –freisetzung genutzt werden. Darüber hinaus sollten Strategien etabliert werden, die eine chemische Fixierung von Enzymen an/in Hydrogelschichten ermöglichen. Mit diesen Zielvorgaben wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- **Etablierung photovernetzbarer temperatur- oder pH-sensitiver Copolymere und Herstellung von Hydrogelschichten zur elektrostatischen Adsorption von Enzymen und von modifizierten, negative geladenen Hefezellen**

Hierzu wurden einfach herstellbare Copolymere (**Abb. 1**), basierend auf dem temperatur-sensitiven Monomer Dimethylaminoethylmethacrylat (DMAEMA) und pH-sensitiven Monomer Diethylaminoethylmethacrylat (DEAEMA) mit verschiedenen Photovernetzern (2-(3,4-Dimethyl-2,5-dioxo-2,5-dihydropyrrol-1-yl)ethylmethacrylat (DIMAM) und Hydroxybenzo-phenonmethacrylat (BP), synthetisiert, charakterisiert und getestet. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Copolymerzusammensetzungen DMAEMA-(DMIMA=4 mol%), DMAEMA-(DMIMA=8 mol%) und DMAEMA-(BP=1mol%) u.a. verwendet. Die synthetisierten Copolymere zeigten auch das zu erwartenden LCST-Verhalten, das für die Herstellung quellbarer und photovernetzbarer Hydrogelschichten zur elektrostatischen Verkapselung von Enzymen unabdingbar ist. Nach einem etablierten Schichtherstellungsverfahren konnten BP-vernetzbare und pH-stabile Schichten (50-200 nm) nach 3 Min hergestellt werden. Dagegen benötigten DMIMA-haltige Schichten (50-200 nm) eine Vernetzungszeit von 15 Min. Die Schichten wurden mit verschiedenen oberflächenanalytischen Methoden (AFM, Ellipsometrie u.a.) charakterisiert. Tiefergehende Untersuchungen an BP-haltigen Schichten (1mol% oder 5mol% BP) zeigten, dass eine effektive Vernetzungszeit von nur 60 Sekunden nötig ist.

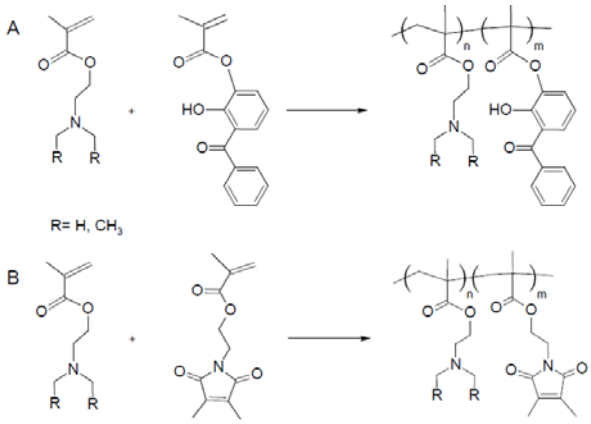


Abb. 1. Übersicht über die synthetisierten Copolymere mit A) Benzophenonmethacrylat und B) DIMAM als photovernetzbare Monomergruppe) R=H entspricht DMAEMA; R=CH3 entspricht DEAEMA.

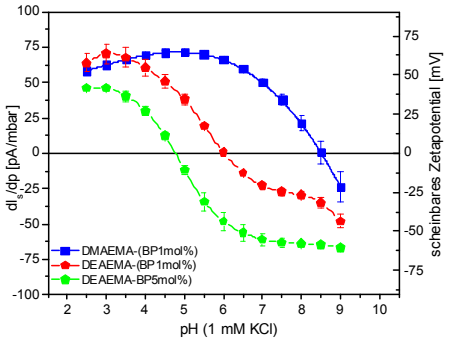


Abb. 2. Strömungsstrom vs. Druckgradient (dI_S/dp) und scheinbares Zetapotential in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung für die verschiedenen Hydrogelfilme in 10^{-3}M KCl Lösung.

Mit diesem Wissensstand wurden pH-abhängige Quellungsversuche und Strömungs-potentialsmessungen zur Ermittlung des Quellverhaltens und der isoelektrischen Punkte der BP-haltigen Schichten u.a. durchgeführt. Hier zeigte sich, dass mit Zunahme des BP-Gehalts in DEAEMA-Copolymerschichten abnehmende isoelektronische Punkte bei pH 6 für 1 mol% BP und pH 5 für 5 mol% BP bestimmt wurden (**Abb. 2**). Oberhalb vom IEP sind die Hydrogelschichten anionisch. Quellungsergebnisse zeigten, dass die Schichten oberhalb von pH 6 im kollabierten Zustand und nur quellbar im saurem pH Bereich vorliegen, wobei der Vernetzungsgrad auch einen Einfluss auf den Quellungsgrad hat.

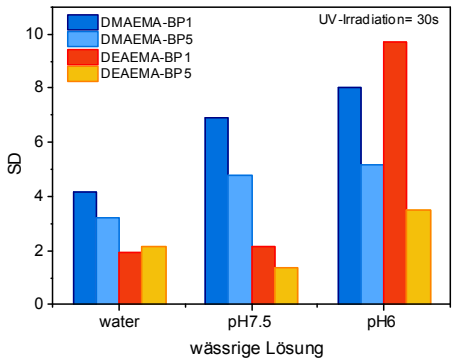


Abb. 3. Volumenquellungsgrad der DMAEMA-BP und DEAEMA-BP Hydrogelschichten in Abgängigkeit vom Vernetzergehalt in verschiedenen wässrigen Medien.

- **Immobilisierung von Enzymen an Hydrogelschichten**

Sowohl DMAEMA-BP als auch DEAEMA-BP Schichten wurden erfolgreich zur Enzymimmobilisierung (ß-Galaktosidase) via elektrostatischer Wechselwirkungen unter pH-sauren Bedingungen (pH 6) untersucht. Mit einem etablierten Enzymtest wurde grundsätzlich die erfolgreiche Immobilisierung des Enzyms bei pH 6 nachgewiesen, wobei eine geringfügige Erhöhung des pH auf 6,2 keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden konnte. Generell ist unter diesen experimentellen Bedingungen eine Quantifizierung immobilisierter Enzyme in diesen Hydrogelschichten noch nicht möglich (Abb. 4). Des Weiteren soll erwähnt werden, dass die eingesetzten dünnen Hydrogelschichten während der Schichtpräparation strukturierbar sind und ebenso enzymatisch aktiv sind.

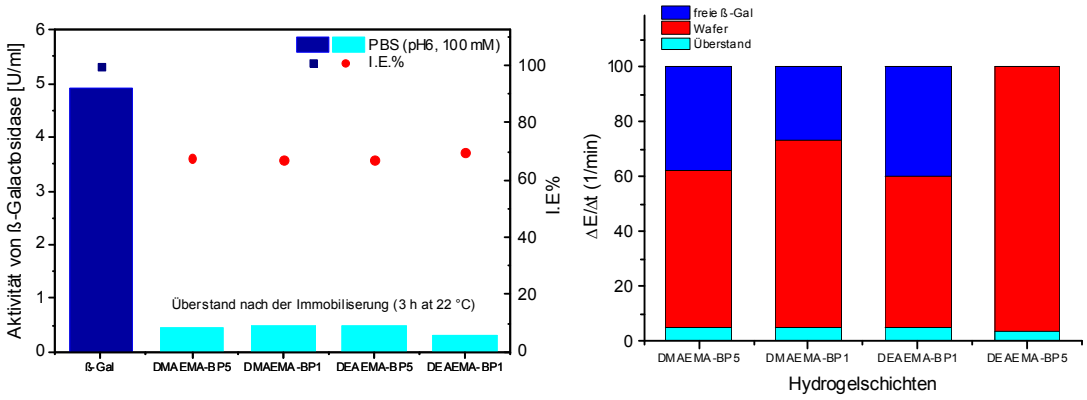


Abb. 4. Aktivitätsmessungen zur Bestimmung des Immobilisierungsgrades der ß-Galaktosidase in verschiedenen Hydrogelschichten: DMAEMA-BP (1 mol%, 5 mol%) und DEAEMA-BP (1 mol%, 5 mol%).

- **Immobilisierung von Hefezellen an Hydrogelschichten**

In Zusammenarbeit mit dem IfWW wurden für den Demonstrator A4-2 „Selbstregulierende Zellabsorption zur Rückgewinnung von Metallionen“ Zelladsorptionsexperimente durchgeführt. Die am IfG erzeugten rekombinanten Hefen (p426-Aga und p423 Aga2)

wurden auf ihre Fähigkeit zur Bindung an gegenpolig geladenen Oberflächen unter definierten Bedingungen untersucht. Als Negativkontrolle dienten Wildtyp Hefezellen, welche keine negativ geladene Cluster besitzen. Für die elektrostatische Bindung wurden positiv geladenen Hydrogelschichten (DMAEMA-BP und DEAEMA-BP) auf funktionalisierten Glassubstraten erzeugt. Leider konnte im Rahmen dieser Versuchsreihen keine bevorzugte Adsorption der Hefezellen an den Hydrogelschichten nachgewiesen werden.

- **Etablierung und Einsatz von photovernetzbaren Hydrogelen zur Immobilisierung von Modellenzymen**

Ziel dieses Arbeitsmoduls war es, zunächst eine in-situ Enzymimmobilisierung während der Herstellung kationischer Bulkhydrogele nachzuweisen. Diese Erkenntnisse sollten dann auf planare Substrate übertragen werden, wobei dann die herzustellenden Enzym-haltigen Hydrogele als 3D-Objekte anzusehen sind, um eine schnellere Permeabilität der Hydrogele zum Austausch von Edukt und Produkt für enzymatische Umsetzungen zu generieren. Die Thematik „Permeabilität von strukturierten Hydrogelen in fluidischen Mikrokanälen bzw. in 3D-Objekten“ wird so nicht in der Literatur diskutiert und wird hier ansatzweise betrachtet. Dabei ist es generell eine große Herausforderung, optimale Bedingungen für Enzyme zu finden, welche weder die Konfirmation noch die Lebensfähigkeit und daraus resultierende Enzymaktivitäten beeinflussen.

Es konnten Bulkhydrogelsysteme basierend auf einem kationischen Monomer (DMAEMA), 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), einem Vernetzer (Polyethylenglycoldiacrylat) und einem Photoinitiator Igacure 2595 mit definierter Geometrie hergestellt werden. Hierbei wurde auf die Flexibilität einer Silikonform zurückgegriffen, die die Herstellung zerstörungsfreier Bulkhydrogele mit unterschiedlichen Zusammensetzungen ermöglichte. Aufgrund des Einbaus vom kationischen DMAEMA wurden unterschiedlich quellbare Bulkhydrogelsysteme unter diversen physiologischen Bedingungen nachgewiesen. Bulkhydrogelsysteme ohne HEMA-Komponente zeigten die nicht gewünschte mechanische Stabilität über einen längeren Zeitraum.

In diesem Zusammenhang überstehen die gewählten Modellenzyme: ß-Galaktosidase (ß-Gal), Meerettichperoxidase (HRP) und die Glucoseoxidase (GOX) eine Bestrahlungszeit von 0-120 s ohne Beeinträchtigung ihrer Aktivität. Das Milieu der Monomerlösung erwies sich für die HRP und GOX als unproblematisch, allerdings nahm die Aktivität der ß-Gal unter basischen Bedingungen um 80 % ab.

Da nun grundlegend die Stabilität der Enzyme unter den gewählten Bedingungen gegeben war, wurden diese in Bulkhydrogele immobilisiert sowie die Aktivität im Vergleich zum freien Enzym nach 2 h und 24 betrachtet. Es ist ebenso zu beobachten, dass die Enzymaktivität der immobiliserten Enzyme weit unterhalb des freien Enzyms liegt (ca. 90 %). Allerdings sind

die Enzyme (außer ß-Gal) nach 24 h immer noch aktiv. Dies spricht für eine zyklische Nutzung der immobiliserten Enzyme. Die verringerten Enzymaktivitäten in den Bulkhydrogelen sind auf eine gehemmte Substratdiffusion innerhalb des Hydrogels zurückzuführen. Das Substrat muss aus der Lösung in das Hydrogel diffundieren und auch nach erfolgreicher Umsetzung wieder hinaus.

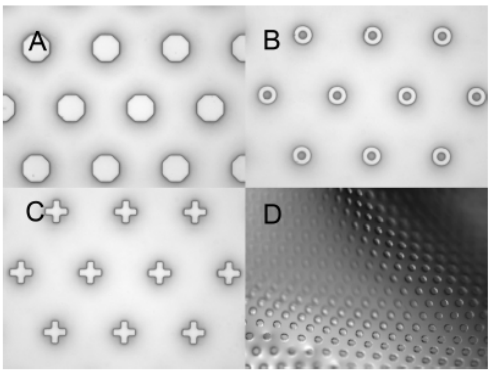


Abb. 6. Lichtmikroskopische Aufnahmen von mikrostrukturierten Hydrogelfilmen auf funktionalisierten SiO_2 Trägern. (A-C) verschiedene Hydrogelstrukturen. (D) Silikonmaske zur Strukturierung von Hydrogellösungen an planaren Substraten via µ-Kontaktdruckens (PTFE-basierende Fotomaske).

Um die Minderung der Enzymaktivität zu umgehen, wurden im Folgenden dünne, strukturierte Hydrogelschichten hergestellt. Die Minimierung der Schichtdicke und die gleichzeitige Vergrößerung der Hydrogeloberfläche sollen für einen optimalen Substrat-transport sorgen und eventuelle Diffusionsbarrieren durchdringen. Dazu wurden die Hydrogellösungen auf einem funktionalisierten Träger aufgetropft und mit Hilfe des µ-Kontakdruckens (PTFE basierende Fotomaske) nach einer Bestrahlungszeit von 20-60 Sekunden ein strukturierter Hydrogelfilm erhalten (**Abb. 6**). Die Strukturierungen dienen, wie bereits erwähnt, der gezielten Oberflächenvergrößerung und somit zur günstigeren Verteilung der Modellenzymen in der Hydrogelschicht. Untersuchungen zur Aktivität der Enzyme in diesen Schichten ergaben leider noch keine Verbesserung der Enzymaktivität im Vergleich zu den im Bulkhydrogel immobilisierten Enzymen.

Zur Erzeugung von separierten Hydrogelstrukturen wurde das ***Nanoplotting*** etabliert. Mit dieser Technik ist es möglich, geometrische Strukturen auf einem funktionalisierten Träger zu generieren und nach der UV Bestrahlung an Substratoberflächen zu binden. Dies hat einen wesentlichen Vorteil, dass verschiedene Enzyme auf einem Träger immobilisiert werden können und somit eine Enzymkaskadereaktion ermöglicht wird. Nach einem Optimierungsprozess stellte sich heraus, dass unterhalb von 2 mol% an Photoinitiator die Vernetzung der abgelegten Hydrogelobjekte auf den Substratoberflächen nicht erfolgreich war. Erst eine Erhöhung des Initiatorgehaltes auf 5 Ma% führte zu stabilen Strukturen, welche innerhalb von 5 s vernetzbar sind (**Abb. 7**).

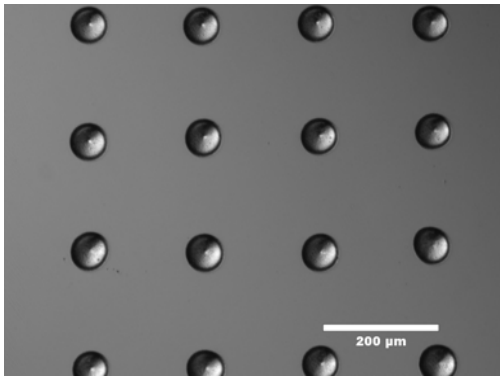


Abb. 7. Strukturierte Hydrogelstrukturen (5 Ma%; Vernetzung nach 5 Sekunden) erzeugt mit dem Nanoplotter der Firma Gesim.

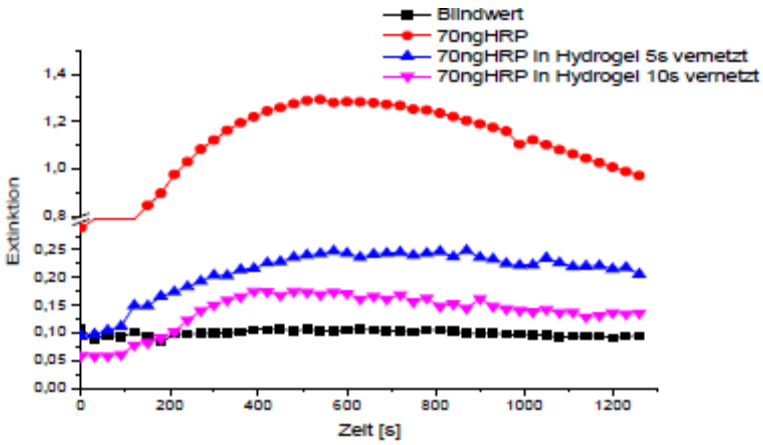


Abb. 8. Aktivitätsuntersuchungen der freien und immobilisierten HRP in PBS Puffer bei pH 6.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde das Modellenzym HRP in diesem Hydrogelsystem mittels Nanoplotting immobilisiert und seine Enzymaktivität untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Enzymaktivität im Vergleich zur freien HRP immer noch gehemmt ist, jedoch konnte eine deutliche Aktivität der HRP nachgewiesen werden (**Abb. 8**). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass aus solchen strukturierten Hydrogeloberflächen nur sehr langsam das Enzym HRP freigesetzt werden kann. Die Daten deuten eher darauf hin, dass wir hier einen stationären Verbleib der HRP in den Hydrogelstrukturen etabliert haben. Weiterhin ist anzumerken, dass genannte Enzymaktivität auch nach mehreren Zyklen zugegen ist.

- **Nutzung der Biokonjugation Biotin-Avidin zur Fixierung von Enzymen an dünnen Hydrogelschichten auf Basis von dendritischen Glycopolymeren**

Zur kovalenten Fixierung von Enzymen an Hydrogelschichten wurde die Biokonjugation Avidin-Biotin verwendet. Hierzu wurden sehr dünne Polyethylenimin-Maltose-(PEI-Mal)-Hydrogelschichten als Plattform eingesetzt. Nach Etablierung eines Verfahrens (Abb. 16) zur

Anbindung von Biotin-haltigen Enzymen wurde jetzt mit Hilfe der *in-situ* Ellipsometrie nachgewiesen, ob tatsächlich Enzyme angebunden werden. In **Abb. 9** wird die erfolgreiche Biokonjugation von HRP und FDH an sehr dünnen PEI-Mal-Hydrogelschichten auf der Basis von Avidin-modifizierten Hydrogeloberflächen vorgestellt.

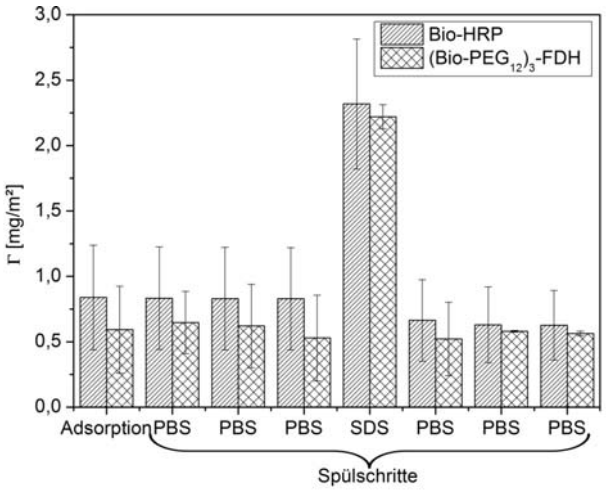


Abb. 9. Biokonjugation von biotinmodifizierten Enzymen FDH (Formiatdehydrogenase) und HRP (Meerettichperoxidase) an Avidin-modifizierten PEI-Mal-Hydrogelschichten mittels *in-situ* Ellipsometrie nachgewiesen.

Selbst nach mehreren Waschschritten der Enzym-modifizierten PEI-Mal-Hydrogelschichten wurde die gewünschte Fixierung der Enzyme festgestellt (**Abb. 9**). Hierzu konnte ebenso in einem Multischichtaufbau zwei Enzyme an einer PEI-Mal-Hydrolgelschicht fixiert werden. Bei allen Enzym-haltigen Hydrogelschichten konnten die gewünschten Enzymaktivitäten nachgewiesen werden, auch an nacheinander durchgeführten Versuchszyklen und nach mehreren Tagen nachweisbar. Weiterhin ist auszuführen, dass die erfolgreiche Realisierung der chemischen Fixierung der Enzyme an Hydrogelschichten darauf beruht, weil in Voruntersuchungen Protein-abweisende Eigenschaften der Hydrogelschichten nachgewiesen worden sind. Die verwendeten PEI-Mal-Hydrogelschichten wurden mit Zitronensäure als Vernetzer etabliert.

- **Vergleich der erhaltenen Ergebnisse zu postulierten Meilensteinen 9 – 11**

Meilenstein 9 ***„Herstellung von Hydrogelen mit nicht-kovalent gebundenen Enzymen (β-Galaktosidase). Überprüfung der Bindungs- und Freisetzungskinetik in Abhängigkeit von Temperatur.“*** wurde erfolgreich bearbeitet, wobei vorwiegend der Bearbeitungsschwerpunkt auf der nicht-kovalenten Bindung der Enzyme im Hydrogel lag sowie auf den Einflussfaktoren der Enzymaktivität. Es konnte keine Freisetzung der Enzyme unter verschiedenen physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden. Dieser Schwerpunkt half, verschiedene Lösungsansätze für die erfolgreiche Bearbeitung der

Meilensteine 10 ***„Herstellung von Hydrogelen mit chemisch fixierten dendritischen Polymeren, die thermisch bzw. pH-induzierte Schaltbarkeit der Hydrogelschicht zum Freisetzen der Enzyme aufweisen“*** und 11 ***„Herstellung von Hydrogelen mit über Spacer kovalent gebundenen Enzymen (β-Galaktosidase oder Protease). Überprüfung der Bindungs- und Freisetzungskinetik sowie Verkapselung der Enzyme in Abhängigkeit vom pH-Wert oder Temperatur.“*** zu etablieren. Diese leichte Schwerpunktsverlagerung war der Herangehensweise geschuldet, dass die Immobilisierung der Enzyme eher kontinuierlich an einer Hydrogeloberfläche bzw. in einer Hydrogelschicht zu binden, vorteilhafter ist, als über einen Zyklusprozess wieder Enzyme aus dem Hydrogel frei zu setzen und dann zu binden. Dadurch sollten ganz einfach Alterungsprozesse vermieden und während der Untersuchungen überwiegend ausgeschlossen werden. Mit dieser leichten Kurskorrektur konnten erfolgreich Enzyme in sehr dünnen strukturierbaren Hydrogelen eingebaut und ihre Enzymlanglebigkeit nachgewiesen werden. Neben dieser permanenten Immobilisierung der Enzyme in strukturierbaren Hydrogelen konnten Enzyme mittels Avidin-Biotin-Konjugation an Hydrogelschichten gebunden und erfolgreich ihre Enzymaktivität unter Zyklusbedingungen, aber auch ihre Langlebigkeit nachgewiesen werden.

ZE:	Förderkennzeichen:
TU Dresden, Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik (ILBT) Professur für Bioverfahrenstechnik Prof. T. Bley	03WKP09A

II. 1 Eingehende Darstellung der Ergebnisse

Der Arbeitsplan des ILBT gliedert sich in die verfahrenstechnische Untersuchung und Optimierung der Fermentationsparameter während der Kultivierung von Hefen zur Herstellung des Poly-Hydrophobins (s. IfG A1-3), die Modellierung und Bilanzierung des Herstellungsprozesses sowie Untersuchungen zum optimalen Einsatz der Proteasen, welche zur Prozessierung des Polyproteins notwendig sind. Hiermit soll in dem Demonstrator A4-3 gezeigt werden, dass aus der Zusammensetzung von einzelnen Modulen des Projektes technisch tragfähige Prozesse abgeleitet werden können. Das hier eingesetzte Polyprotein steht modellhaft für all jene Proteine, bei denen die biotechnologische Produktion des authentischen Proteins schwierig oder unmöglich ist (z.B. toxische Proteine) und die in einem zweistufigen Prozess erst als Vorläuferprotein von Zellen gebildet und dann zur Aktivierung prozessiert werden können.

A1: Ferm*entation zur Bildung eines Polyproteins*

Ziel der Arbeiten war es, die Herstellung des HFB1-Polyproteins in Hefe unter verfahrenstechnischen Gesichtspunkten zu optimieren.

Die vom IfG unter A1-3 bereit gestellten Hefen wurden in Bioreaktoren kultiviert und die Kultivierung hinsichtlich der Poly-Protein Stabilität, eines optimalen Entezeitpunktes und optimaler Ausbeute untersucht. Hierzu sollte im Fall des Poly-Hydrophobin-EGFP Konstruktes das Flow-Cytometer eingesetzt werden, um einen optimalen Erntezeitpunkt zu ermitteln. Zudem sollte der Stamm ermittelt werden, der das Zielprotein am stabilsten produziert. Die in der Fermentation gewonnenen Daten sollen zur Bewertung der Produktionsstämme verwendet werden.

A1-1: Durchführung und Optimierung von Fermentationsprozessen zur Herstellung und Anreicherung des Hydrophobin-Polyprotein/eGFP-Fusionsproteins mit Hefe mittels flowcytometrischer Analyse (eGFP-Detektion), elektrophoretischer Nachweis des Hydrophobin-Polyproteins

Es wurden alle vier vom IfG bereit gestellten Poly-Hydrophobin exprimierenden Stämme in Bioreaktoren unter kontrollierten Bedingungen fermentiert. Die Verläufe der Kultivierung er Poly-Hydrophobin Stämme HFB1-CCG2 (HC-Stamm) und HFB1-CCG2-EGFP (HCE-

Stamm) sind in Abb. 1 dargestellt. Die Verläufe der Optischen Dichte (OD) zeigen einen typischen Wachstumsverlauf. Nach einer kurzen Lag-Phase wachen die Zellen exponentiell und erreichen am Ende der Kultivierungszeit eine maximale OD von ca. 8 Units. Die Fluoreszenzintensität der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrischer Messungen bestimmt, die Mittelwerte der vermessenen Zellen wurden dabei in den Proben bestimmt und im Diagramm dargestellt (Abb. 1a rot, 1b grün). Dabei erreichten die Zellen, die das Poly-Hydrophobin ohne EGFP exprimieren, maximale Werte von 0.6 Unit am Ende der Kultivierung. Dieser Wert entspricht somit der Auotofluoreszenz der Zellen. Die maximale Fluoreszenz-intensität, die für den Stamm HCE gemessen werden konnte, betrug am Ende der Kultivierung 1.0 Unit. Die relativ geringe Fluorszenz des HCE Stammes kann durch die schlechte Stabilität des HCE Proteins erklärt werden, welche auch im Western Blot deutlich wird (Abb. 1 d). Das intakte Protein besitzt eine Größe von ca. 56 kDa. Die niedermolekularen Banden, die sowohl intrazellulär in der Fraktion des Ganzzellysates als auch in der Fraktion des Überstandes detektiert werden konnten, sind Degradationsprodukten zuzuordnen. Diese degradierten Proteine verfügen sehr wahrscheinlich über keine Fluoreszenz. Der starke Abbau des HCE Proteins könnte durch die Größe des Proteins erklärt werden oder auch durch die eingefügten Proteaseschnittstellen, die zur Destabilisierung beitragen. Somit scheint das HCE Protein nicht geeignet, um ein starkes Fluoreszenzsignal auszulösen. Im Fall des HC-Stammes war ebenfalls ein Abbau des HC-Proteines intrazellulär und auch im Überstand detektierbar, wobei der Expressionslevel und auch der Sekretionslevel bei diesem Stamm höher war als bei dem zuvor beschrieben HCE-Stamm.

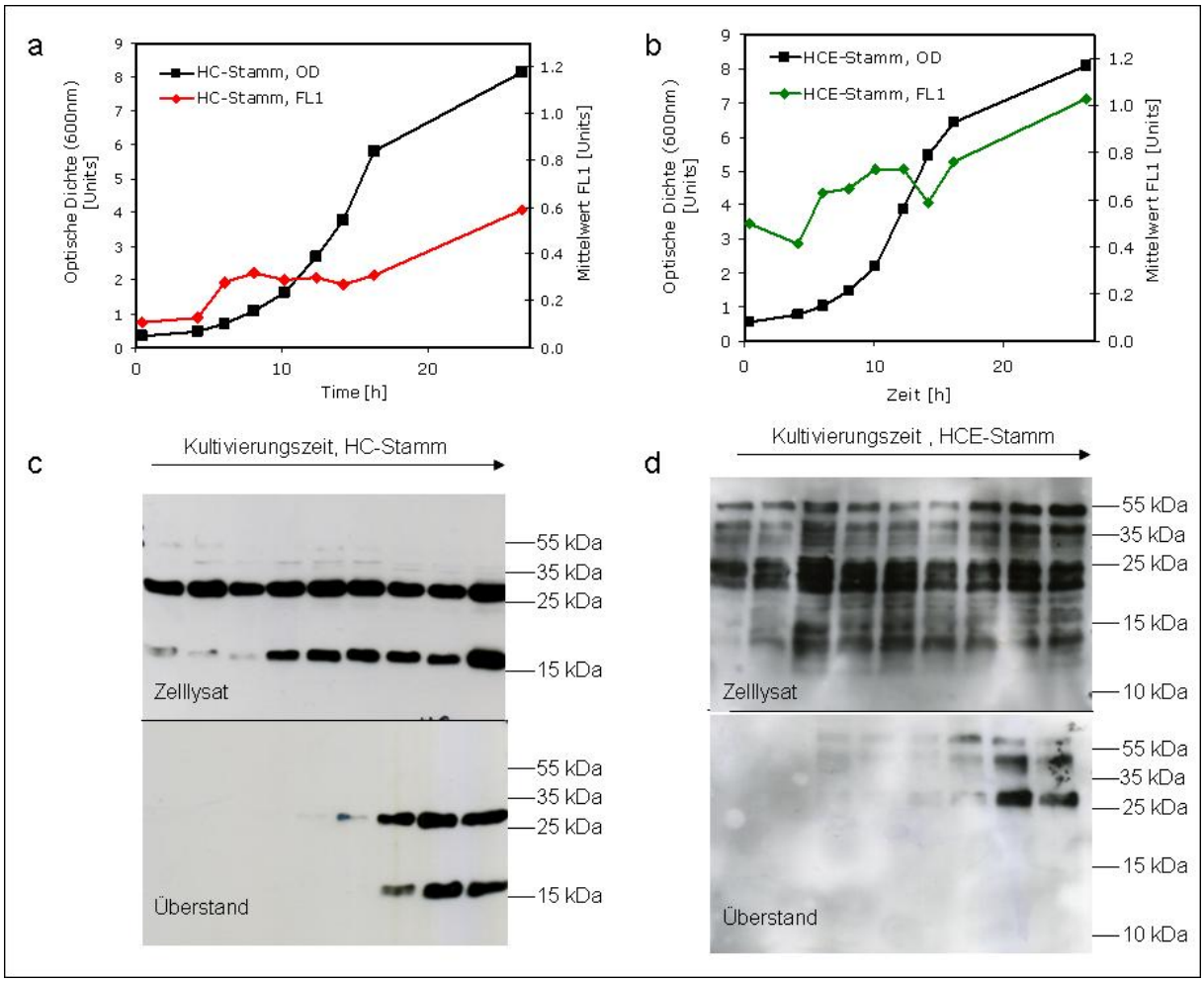


Abbildung 10: Kultivierungsverläufe der Poly-Hydrophobin bildenden Stämme HC-Stamm (a) und HCE-Stamm (b), schwarz = Optische Dichte, rot = Mittelwert der Fluoreszenz der im Durchflußzytometer vermessenen HC-Zellen, grün = Mittelwert der Fluoreszenz der im Durchflußzytometer vermessenen HCE-Zellen, Western Blot Detektion gegen c-myc Tag, (c) HC-Stamm, (d) HCE-Stamm, oberer Teil der Abbildung 30 µg Ganzzelllysat, unterer Teil der Abbildung = 1.8 mL Überstand, mittels Säurefällung eingeengt.

A1-2: Modellierung und Bilanzierung der unter A1-2 gewonnenen Daten

In beiden oben beschriebenen Kultivierungen konnte eine wachstumsgekoppelte Produktbildungskinetik festgestellt werden, so dass der optimale Entezeitpunkt den Moment in der Kultivierung darstellt, wo die Glucose komplett verstoffwechselt ist. Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, wurden zwei weitere Poly-Hydrophobin produzierende Stämme im Bioreaktor kultiviert. Die Ergebnisse dieser Kultivierungen sind in den Abb. 2 für den hh-Stamm und in Abb. 3 für den Hh-Stamm dargestellt. Im Teil a der Abbildungen sind die offline Daten der Optische Dichte, der Biotrockenmassekonzentration und der Glucose Konzentration als auch der online gemessene Gelöstsauerstoffgehalt dargestellt. Die Ergebnisse der Western Blot Detektion sind im Teil b der Abbildungen aufgeführt.

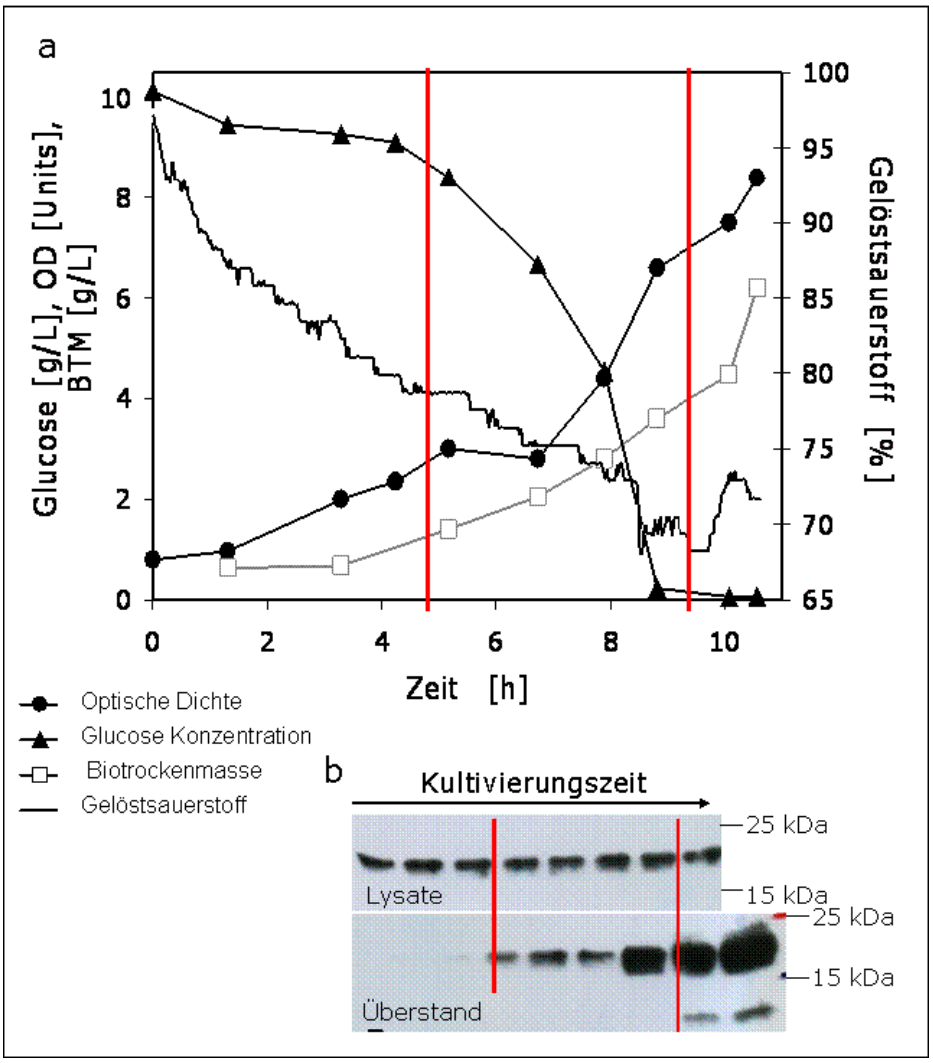


Abbildung 11: Kultivierungsverläufe des Poly-Hydrophobin Stämme hh-Stamms (a). Die Proben wurden während der Kultivierung im Bioreaktor gezogen und die Optische Dichte, die Biotrockenmasse sowie die Glucosekonzentration bestimmt. Online wurde der Gelöstsauerstoffgehalt in der Kulturbrühe gemessen. Die Proben wurden zentrifugiert, das Zellpellet und der Überstand der Proben wurden im Western Blot analysiert (b) Detektion erfolgte gegen den c-myc Tag, oberer Teil der Abb. 20 µg Ganzzelllysat, unterer Teil der Abb. = 1.8 mL Überstand, mittels Säurefällung eingeengt. Der erste rote Balken markiert den Zeitpunkt in der Kultivierung, zu dem das Protein im Überstand detektiert werden konnte, der zweite rote Balken symbolisiert den Zeitpunkt, an dem die Glucose im Bioreaktor komplett verstoffwelchselt war.

Für die beiden Stämme konnten maximale Wachstumsraten von 0,30 1/h für den hh-Stamm und 0,33 1/h für den Hh-Stamm ermittelt werden. Zudem wurden Ausbeutekoeffizienten für die eingesetzte Glucose von 0,59 g/g für den hh-Stamm und 0,53 g/g für den Hh-Stamm ermittelt werden. Diese Werte sind für Kultivierungen mit Glucose als Kohlenstoffquelle typisch und vergleichbar zu Kultivierungen in denen andere rekombinante Proteine exprimiert wurden (maximale Wachstumsrate von 0,29 1/h und Ausbeutekoeffizienten von 0,54 g/g im Fall eines Stammes der Monomeres Hydrophobin produziert).

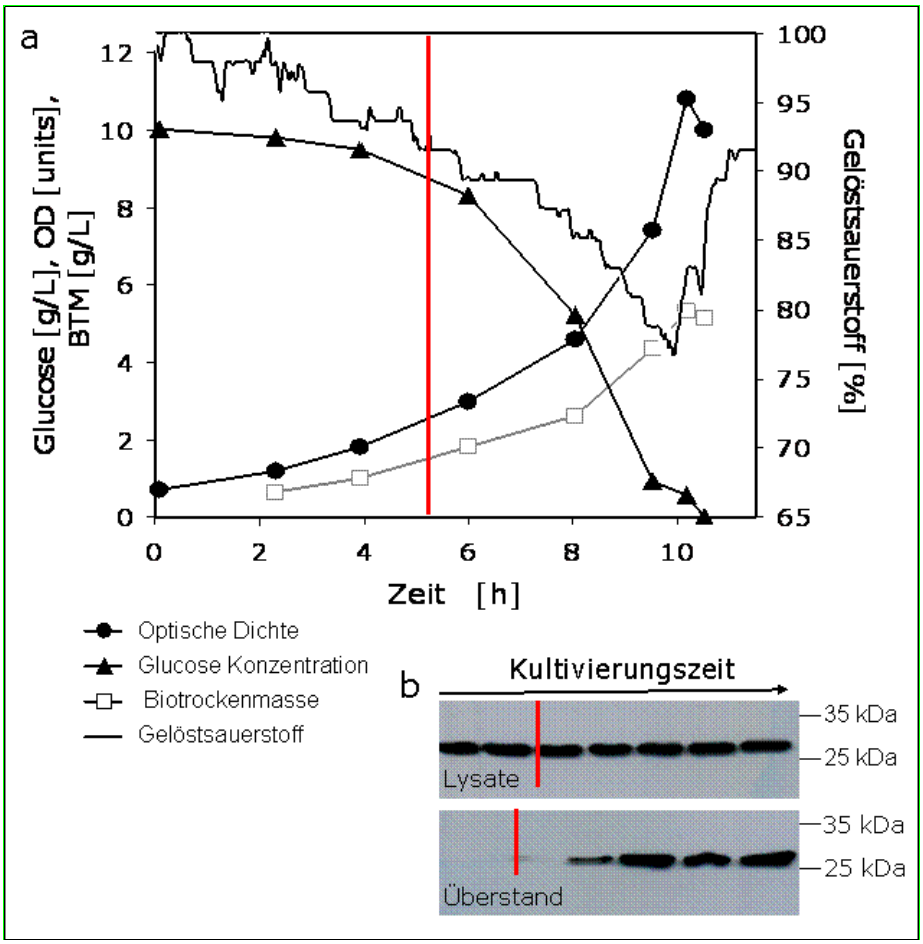


Abbildung 12: Kultivierungsverläufe des Poly-Hydrophobin Stämme Hh-Stamms (a). Die Proben wurden während der Kultivierung im Bioreaktor gezogen und die Optische Dichte, die Biotrockenmasse sowie die Glucosekonzentration bestimmt. Online wurde der Gelöstsauerstoffgehalt in der Kulturbühe gemessen. Die Proben wurden zentrifugiert, das Zellpellet und der Überstand der Proben wurden im Western Blot analysiert (b), Detektion erfolge gegen den c-myc Tag, oberer Teil der Abb. 20 µg Ganzzelllysat, unterer Teil der Abb. = 1.8 mL Überstand, mittels Säurefällung eingeengt. Der rote Balken markiert den Zeitpunkt in der Kultivierung zu dem das Protein im Überstand detektiert werden konnte.

Es konnte gezeigt werden, dass das Poly-Hydrophobin in beiden Fällen in den Kulturüberstand sekretiert wurde. Zudem war die Stabilität der Proteine hh und Hh wesentlich höher im Vergleich zu den HC und HCE Stämmen. Abbaubanden konnen erst nachdem die Glucose komplett verstoffwechselt wurde detekiert werden. In dem Moment steigt der online gemessene Gelöstsauerstoff wieder sprungartig an. Die Zellen hören nun auf zu Atmen und somit wird weniger Sauerstoff verstoffwechselt. Der optimale Ernetezeitpunkt, an dem die Poly-Hydrophobine noch intakt sind ist somit online am Gelöstsauerstoffgehalt im Bioreaktor ablesbar. Somit kann die Kultivierung auch ohne die Verwendung eines Fluorszenzsignals optimal überwacht werden. Die Meilensteine 12 und 13 wurden somit erreicht.

Meilenstein 12 (ILBT):

Fermentation und Nachweis der Anreicherung (intra- oder extrazellulär) von HFB1 mittels Flow-Cytometrie und Elektrophorese

Meilenstein 13 (ILBT):
Bilanzierung und Modellierung des Prozesses aus den gewonnenen Daten

A2: Prozessierung des Polyproteins

In einem nächsten Schritt zur effektiven Herstellung des oberflächenaktiven Hydrophobin-Monomers sollte eine Spaltung des HFB1-Polyproteins mittels der TEV-Protease erzielt werden.

Der Einsatz einer Protease ist sehr kostenintensiv, daher sollte der Einsatz der Protease optimiert werden. Zudem sollte die Rückgewinnung der Protease nach Ablauf der Spaltreaktion aus dem Reaktionsansatz erarbeitet werden.

Zunächst musste ein Protokoll etabliert werden zur Anreicherung des Polyproteins. Nach erfolgreicher Anreicherung des Polyproteins wurde die proteolytische Spaltung untersucht und optimiert (Inkubationszeit, Temperatur, verschiedene Proteasen von unterschiedlichen Firmen).

A2-1: Optimierung der Anreicherung des löslichen Hydrophobin-Polyproteins aus dem Fermentationsprozess, Untersuchung der Stabilität des Hydrophobin-Polyproteins hinsichtlich proteolytischen Abbaus.

Zur Anreicherung des Poly-Hydrophobins aus dem Kulturüberstand wurden zwei verschiedene Methoden untersucht. Zum einen erfolgte eine Säurefällung mittels TCA, um Proteine aus dem Überstand einzuengen. Die Ergebnisse dieser Fällungen sind in den unteren Teilen der Western Blot Analysen in den Abb. 1,2 und 3 sichtbar. Als eine weitere sehr geeignete Methode erwies sich die **Größenausschluss-zentrifugation**, die mit einem Filter von 10 kDa Porengröße durchgeführt wurde. Die Proteine, die für die weiteren Untersuchungen zum proteolytischen Abbau mittels TEV-Protease eingesetzt wurden, wurden durch Größenausschlusszentrifugation gewonnen.

Untersuchung des proteolytischen Abbaus des Poly-Hydrophobins durch Einsatz der TEV-Protease.

Nach der Konzentrierung des Poly-Hydrophobins mittels Größenausschluss-zentrifugation wurden die Poly-Hydrophobine mit der TEV-Protease inkubiert. Es wurden TEV-Proteasen von zwei verschiedenen Herstellern getestet. Es wurden 0.4 Units der Protease pro

eingesetztem µg Protein verwendet. Die Reaktionsansäzte wurden bei 30 °C inkubiert, es wurden Proben zu Beginn (0 h) nach 2 h, 4 h, 6 h, 10 h, und 22 h genommen und immunologisch im Western Blot analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt. Im Teil c der Abb. ist ein Polyhydrophobin schematisch dargestellt. Ein Hydrophobin Baustein ist mit dem c-myc Tag, ein weiterer Hydrophobin Baustein mit einem HA Tag fusioniert. Aus diesem Grund wurden Antikörper gegen beide Tags in der immunologischen Detektion verwendet. Die Detektion gegen den c-myc Tag ist in Abb. 4a , jene gegen den HA-Tag in Abb. 4b gezeigt. Das Poly-Hydrophobin ist mit einer Größe von ca. 20 kDa mit beiden Antikörpern in den Western Blot Analysen nachweisbar. Im Falle der Invitrogen TEV-Protease ist schon nach zwei Stunden ein deutlicher Rückgang der Poly-Hydrophobin Menge sichtbar bei gleichzeitiger Zunahme der monomeren Hydrophobin-Bausteine mit einer Größe von 10 k Da (Abb. 4a) und 9 kDa (Abb. 4b). Nach ca. 4 h Inkubation ist das Poly-Hydrophobin nahezu vollständig gespalten und nur noch die monomeren Hydrophobin Bausteine sind nachweisbar.

Auch bei Verwendung der Promega TEV-Protease konnte eine Spaltung des Poly-Hydrophobins in seine monomeren Bausteine detektiert werden, jedoch dauerte der Umsetzungsprozess länger. Nach ca. 6 h konnte die größte Menge an monomeren Bausteinen detektiert werden. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führte zu einer weiteren Spaltung des Poly-Hydrophobins, jedoch konnte auch eine Reduktion des Monomeren Bausteins beobachtet werden. Das monomere Hydrophobin ist jedoch unter diesen Reaktionsbedingungen am stabilsten, auch wenn das Poly-Hydrophobin nicht vollständig umgesetzt werden konnte. Das Kontrollexperiment ohne Einsatz von einer Protease zeigte auch einen leichten Abbau des Poly-Hydrophobins, der jedoch nicht vergleichbar war im Vergleich zu den Ansätzen mit Protease.

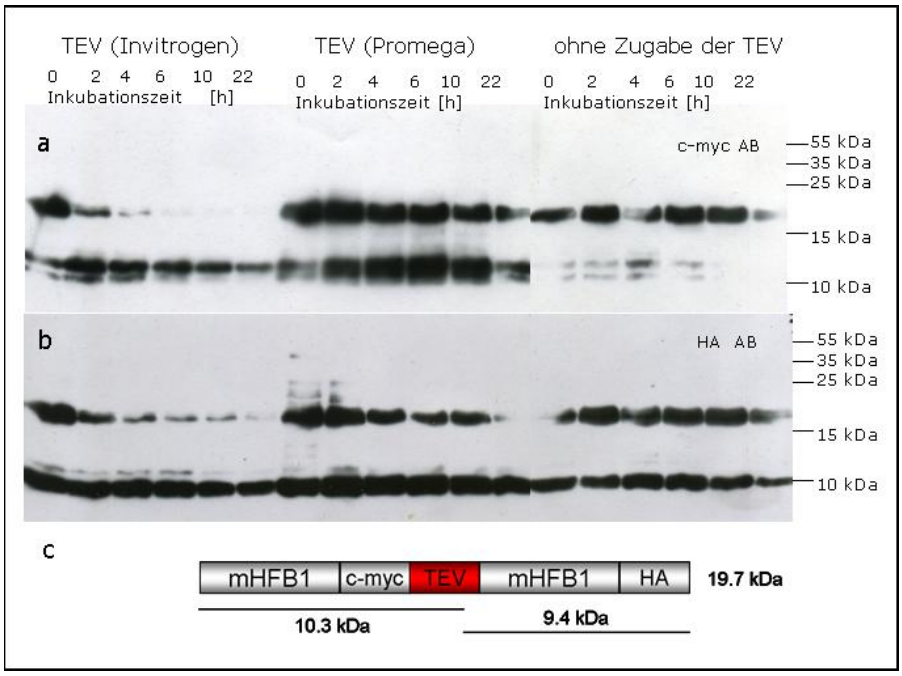


Abbildung 13: Der proteolytische Abbau der Poly-Hydrophobine in seine monomeren Bausteine durch Einsatz der TEV-Protease. (a) Immunologische Detektion unter Verwendung des c-myc Antikörpers, (b) Immunologische Detektion unter Verwendung des HA Antikörpers. (c) Schematische Darstellung des Poly-Hydrophobins. Das Poly-Hydrophobin hh wurde mit zwei unterschiedlichen TEV-Proteasen behandelt, zum einen mit der TEV-Protease von Invitrogen und zum anderen mit jener von Promega, ein weiterer Ansatz erfolgte ohne Zugabe von TEV-Protease. Die Lösungen wurden bei 30°C bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 500 rpm inkubiert. Proben wurden nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 10 h und 22 h gezogen und analysiert.

Es wurden verscheidene Puffer getestet, mit unterschiedlichen Konzentrationen von denaturierenden Substanzen wie DTT oder β-Mercaptoethanol. Diese führten zu keiner verbesserten Spaltungsreaktion. Auch unterschiedliche Temperaturen im Bereich 20-35 °C zeigten einen Einfluss auf das System.

Als **optimale Konditionen für die Spaltung des Poly-Hydrophobins** des Stammes hh konnte somit folgende Papameter bestimmt werden: Promega TEV-Protease (0,4 Unit/µg Protein), 30 °C, Schüttelfrequenz von 500 rpm, 0,1 mM DTT im Standard-Reaktionspuffer der Firma Promega, Inkubationszeit von 6 h. Hiermit konnte die größte Menge an monomeren Hydrophobin erzeugt werden.

***A2-2*: *Downstream*-Processing: Prozessierung des Hydrophobin-Polyproteins in seine oberflächenaktiven Monomere mittels TEV-Protease und Reinigung des Proteins Hfb1, Untersuchung der Aktivität (hinsichtlich der einzusetzenden Konzentration), Stabilität und Halbwertszeit der TEV-Protease sowie deren Rückgewinnung (z.B. über geeigneten Tag)**

Reinigung des monomeren Hydrophobins

In einem nächsten Schritt sollte eine geeignete Methode gefunden werden, um die monomeren Hydrophobin Bausteine aufzukonzentrieren. Das wichtigste Kriterium für eine geeignete Methode liegt im Erhalt der Aktivität der Hydrophobine, allen voran ihrer Oberflächenaktivität. Diese kann mit eine Filmwaage bestimmt werden, mit der der Oberflächendruck gemessen werden kann. Sind Hydrophobine aktiv und funktional, so lagern sie sich an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Luft an. Wenn die Proteine auf der Oberfläche der Flüssigkeit durch eine Barriere verdichtet werden, kommt es zu einem mit einer Filmwaage messbaren Anstieg des Oberflächendrucks. Diese Methode wurde verwendet, um die Aktivität der Hydrophobine nach ihrer Reinigung zu überprüfen. Eine Lösung mit monomeren Hydrophobinen, die zuvor mittels Größenausschlusszentrifugation gewonnen wurden, wurde hier als Ausgangsmaterial verwendet und mit (N) wie natives Protein bezeichnet. Mit 400 µg Proteinen aus dieser nativen Lösung wurden drei verschiedene Fällungsmethoden untersucht: eine Salzfällung mit Ammoniumsulfat, eine Lösungsmittelfällung mit Methanol-Chloroform und eine Säurefällung mit Trichloressigsäure (TCA). Nach den Fällungsreaktionen wurden die Proteinpellets in 300 µL PBS Puffer aufgenommen, davon wurden 10 µL im Western Blot analysiert (Abb. 5b) und 200 µL wurden mittels Filmwaage vermessen (Abb. 5a).

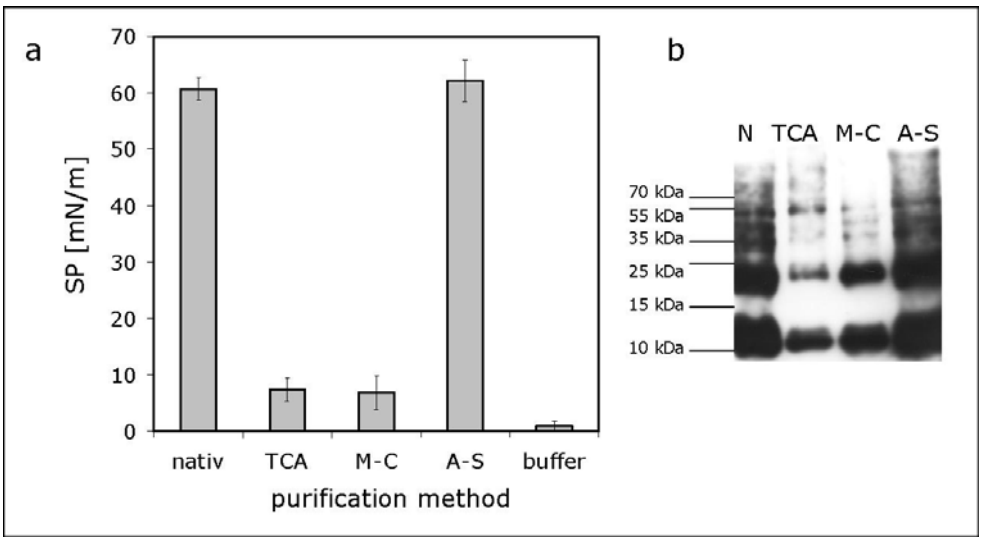


Abbildung 14: Fällungsmethoden für die Anreicherung von Hydrophobin. (a) Oberflächendruck-messung mittels Filmwaage im Langmiur Blodgett System. Es wurden Proben nach drei verschiedenen Fällungsmethoden vermessen, ferner das Ausgangsmaterial für die Fällungsreaktionen. (b) Immunologische Detektion von 10 µL des Ansatzes nach Fällungsreaktion. N = native Proteinlösung, Ausgangsmaterial, TCA = Säurefällung mittels TCA, M-C = Lösungsmittelfällung über Methanol-Choloform, A-S = Salzfällung über Ammoniumsulfat. Die Messungen wurden dreimal mit einer Probe gemacht, es wurden die Mittelwerte gebildet und deren Stardardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt.

Im Fall des nativen Hydrophobins kann im Western Blot in der Höhe von ca. 10 kDa eine starke Bande detektiert werde. Diese entspricht der monomeren Einheit eines Hydrophobins. Die höhermolekularen Banden sind Multimere. Da native Hydrophobine in Lösung die Fähigkeit haben mit sich selbst zu reagieren, assemblieren sie zu multimeren Strukturen. Im Fall der TCA- und der Methanol-Chloroform-Fällung wird eine Reduktion der detektierbaren Hydrophobinmenge deutlich. Dies deutet auf einen signifikanten Verlust an Hydrophobin bei diesen Methoden hin. Im Fall der Ammoniumsulfat-Fällung sind die detektierten Mengen vergleichbar mit dem Ausgangsmaterial, offenbar geht diese Methode mit nur geringem Verlust an Hydrophobin einher.
Oberflächenaktivität: Aktives, natives Protein kann einen maximalen Oberflächendruck von 60 mN/m erzeugen. Die reine Pufferlösung erreicht Werte von unter 1 mN/m. Proteine nach Behandlung durch TCA Fällung und die Methanol-Chloroform Fällung erzielten nur Werte um die 7 mN/m. Dies deutet darauf hin, dass diese Fällungsreaktionen zu einem Aktivitätsverslust führen. Proteine nach Ammoniumsulfat Fällung hingegen erreichen Werte von 60 mN/m, vergleichbar mit dem nativen Ausgangsmaterial. **Dieses Experiment verdeutlicht, dass die Ammoniumsulfat Fällung eine sehr geeignete Methode ist, um Hydrophobine aktiv und in hoher Widerfindungsrate aus wässrigen Lösungen zu reinigen.**

Rückgewinnung der TEV-Protease aus dem Reaktionsansatz

Die TEV-Protease ist ein teures Enzym und sollte nach dem Einsatz recycelt werden. Die TEV-Protease von Promega ist nach Angaben des Herstellers ca. 50 kDa groß und mit einem His-Tag versehen. Somit ist es möglich, das Protein im Western Blot immunologisch nachzuweisen. Zur Rückgewinnung der TEV Protease wurde die Methode der Größenausschlusszentrifugation getestet. Dazu wurden Filter mit verschiedenen Porengrößen eingesetzt. Das monomere Hydrophobin mit einer Größe von 10 kDa würde zusammen dem Poly-Hydrophobin in 10 kDa Filter verbleiben. Aus diesem Grund sollten neben dem 10 kDa Filter auch noch Filter mit erheblich größeren Poren getestet werden. Es wurden Filter mit 30 kDa und 50 kDa Porengröße auf ihre Fähigkeit, die TEV-Protease zu filtern, untersucht. Zunächst wurde ein Reaktionsansatz pipettiert, der aus PBS Puffer, dem Protease Puffer, DTT und der TEV Protease zusammengesetzt war, entsprechend der Standardzusammensetzung eines TEV-Verdaus. Dann wurde dieser Ansatz zu gleichen Volumina auf vier Anteile aufgeteilt. Mit X wurde das Ausgangsmaterial bezeichnet. Die anderen Ansätze wurden nach dem verwendeten Filter benannt, 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa. Die Proben wurden auf die Filter aufgetragen und dann zentrifugiert (5 min, 14000 rpm). Durchlauf (R) und Filtrat (F) wurden dann im SDS PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt sowie der Western Blot unter Verwendung anti-His-

Antikörpers detektiert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 6 dargestellt. Links ist im gefärbten Proteingel deutlich im Reaktionsansatz die 50 kDa große TEV-Protease zu sehen (Abb. 6, links, X). Zudem kann eine Bande mit niedigerem molekularen Gewicht detektiert werden. Dabei handelt es sich um die TEV-Protease, die sich autokatalytisch selbst gespalten hat. Dieses Ergebnis zeigt bereits, dass eine Rückgewinnung der TEV-Protease nicht nur bedeutet, das Protein zurück zu gewinnen, sondern es als vollständiges Protein zu gewinnen. Diese beiden Banden können auch im Western Blot detektiert werden.

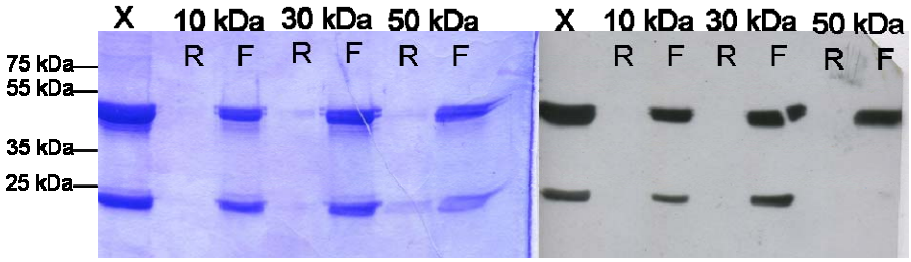


Abbildung 15: Rückgewinnung der TEV-Protease über Größenausschlusszentrifugation. Dazu wurden verschiedene Filter mit unterschiedlichen Porengrößen verwendet, 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa Porengröße. Nach Separation durch Zentrifugation wurden die Proben im SDS PAGE anhand ihrer Größe aufgetrennt. Links: Coomassie gefärbtes Gel, recht: Western Blot Detektion mittels His-Antikörper. X = Ausgangsreaktionsansatz, mit 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa sind die für die Probenbearbeitung verwendeten Filter gekennzeichnet, R = Durchlauf, F = Filtrat.

Die Proben, die nun mit Größenausschlusszentrifugation behandelt wurden, zeigten alle weder im Gel noch im Western Blot für den Durchlauf ein nennenswertes Signal. Dies bedeutet, dass alle drei Porengrößen, selbst der 50 kDa Filter in der Lage ist das vollständige Protein (ca. 50 kDa) zurück zu halten. Im Falle der 10 kDa und 30 kDa ist jedoch auch das Abbauprodukt der TEV-Protease im Filtrat verblieben. Im Falle des 50 kDa Filters ist diese Abbaubande nicht mehr detektierbar, jedoch auch nicht im Durchlauf, dies lässt vermuten, dass das Abbauprodukt der TEV-Protease im Filter verblieben ist. **Diese Versuchsergebnisse zeigen, dass eine effektive Rückgewinnung der TEV-Protease durch Einsatz der Größenausschluss-zentriugation mit einem Filter mit einer Porengröße von 50 kDa erzielt werden kann.**

Der Meilenstein 14: Optimierung der Anreicherung des Hfb1-Polyproteins, Prozessierung mit TEV-Protease, Reinigung von Hfb1 und Rückgewinnung von TEV, wurde erreicht.

A3: Optimierter Herstellungsprozess für HFB1

Aus den unter A1 und A2 erarbeiteten Daten wird ein gesamter optimierter Herstellungsprozess entworfen, der in seiner Gesamtheit exemplarisch durchgeführt und bilanziert wird.

***A3-1*: Ableitung des optimierten Prozesses aus den unter A1 und A2 ermittelten Daten, Optimierung des Sensor (eGFP)-Aktor (Protease)-Systems (⇒ bei einer bestimmten Konzentration an gebildetem eGFP-Hydrophobin-Fusionsprotein soll über einen technischen Schalter die Freisetzung der TEV-Protease induziert werden.)**

Ansatz 1: Produktion von Hydrophobinen in Form von Poly-Hydrophobinen

Da das Poly-Hydrophobin-EGFP Protein sehr instabil ist und während des Produktionsprozesses bereits schon intrazellulär abgebaut wurde (Abb. 1), ist die Kontrolle des eines technischen Schalters darüber nur schwer umsetzbar. Im Laufe der Fermentationsoptimierung wurde jedoch festgestellt, dass die Produktion der Poly-Hydrophobine Hh und hh, wachstumsgekoppelt verläuft. Der Abbau dieser Proteine setzt erst nach Eintreten der Glucoselimitation am Ende der Kultivierung ein. Wenn die Glucose komplett verstoffwechselt ist, kommt es zum einem sprunghaften Anstieg des Gelöstsauerstoffgehaltes, der während einer Fermentation einfach messbar ist. Dies dient dann dem Abbruch des Kultivierunsprozesses und stellt den optimalen Erntezeitpunkt dar. Aus diesem Grund wird der komplette Prozess wie folgt geplant: Als Produktionsstamm wird der hh-Stamm verwendet, da er die beste Spaltungskinetik aufwies. Es erfolgt ein Batch geführter Kultivierungsansatz, in dem mit einem synthetischen Medium gearbeitet wird, welches mit 10 g/L Glucose angereichert ist. Der pH-Wert wird während der Kultivierung konstant auf einen für Protein und Expressionswirt optimalen Wert von 6.0 geregelt. Nach vollständiger Verstoffwechselung der Glucose wird der Prozess abgebrochen und die Zellen vom Überstand mittels Zentrifugation getrennt. Danach erfolgt die Aufkonzentriereung des Poly-Hydrophobins über eine Größenausschlusszentrifugation mit einem 10 kDa Filter. In einem nachfolgenden Schritt wird dann das Poly-Hydrophobin durch Zugabe der TEV-Protease in seine monomeren Bausteine zerlegt. Anschließend soll die TEV Protease mittels Größenausschlusszentrifuagtion mit einem Filter von 50 kDa zurückgehalten werden. Der Durchfluss wird durch Salzfällung mit Ammoniumsulfat eingeengt und das so gewonnene monomere Hydrophobin auf seine Aktivität untersucht. Der komplette Verlauf ist in Abb. 7 dargestellt. Die Ergebnisse diese Produktionsverlaufes sind in Abschnitt A3-2 dargestellt.

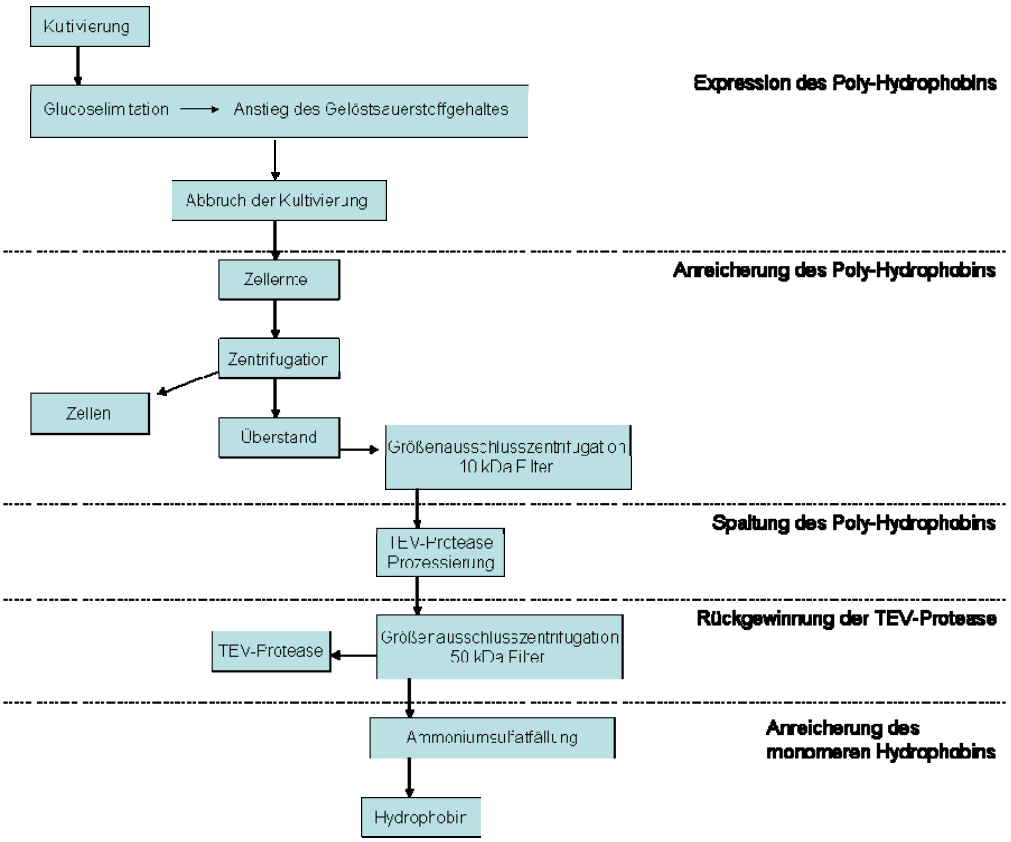


Abbildung 16: Darstellung des gesamten Prozesses der aus den in A1 und A2 ermittelten Daten abgeleitet wurde über die Expression des Poly-Hydrophobins, die Anreicherung dieses Proteins, die Spaltung mittels TEV-Protease und ihrer Rückgewinnung bis zur Anreicherung des monomeren Hdrophobins.

Der hier beschriebene Prozess zeigt beispielhaft, dass man die Eigenschaften von Proteinen maßgeblich dadurch beeinflussen kann, dass man sie als Poly-Proteine exprimiert. Damit soll v.a. die rekombinante Herstellung toxischer oder schwer herstellbarer Proteine verbessert werden.

Im Falle des Hydrophobins, das keine toxische Wirkung auf den Expressionswirt zeigte, ist aber auch eine zweite, von diesem Ansatz unabhängige Produktionsvariante denkbar, die im Folgenden kurz dargelegt werden soll.

Ansatz 2: Produktion von monomeren Hydrophobinen mit integrierter Reinigung mittels Schaumseparierung während der Kultivierung

Da Hydrophobine als oberflächenaktive Substanzen an Flüssigkeits-Gas-Grenzflächen assemblieren, soll eine Schaumseparierung gekoppelt an einen Kultivierungsprozess untersucht werden. Hierbei wird zur optimalen Herstellung des Hydrophobins ein Stamm kultiviert, der kein Poly-Hydrophobin, sondern das aktive monomere Hydrophobin bildet. Über die Begasung des Bioreaktors soll das Hydrophobin im Schaum angereichert werden und schon während der Kultivierung über die Schauseparierung akkumuliert werden. Diese

Variante wurde zu dem in Ansatz 1 beschieben Ansatz getestet. Die Ergebnisse sind in Abschnitt A3-2 dargestellt.

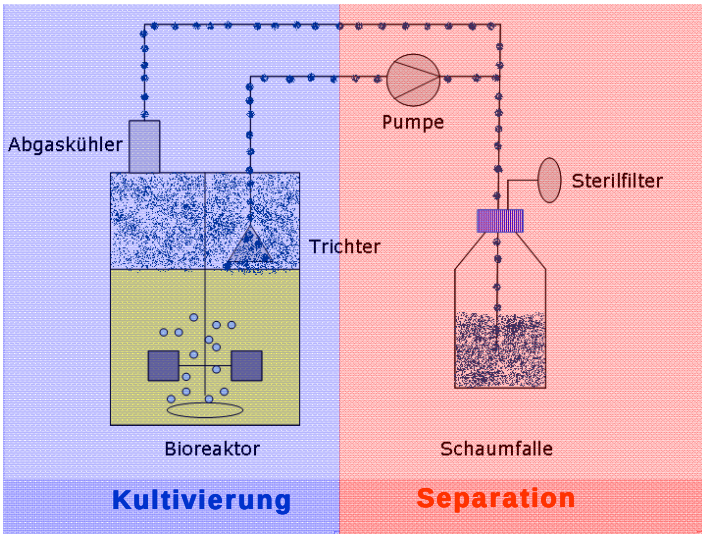


Abbildung 17: Darstellung des Bioreaktoraufbaus mit angeschlossener Schaumseparierungseinheit. Dieser Reaktorbau wurde in Ansatz 2 verwendet und stellt eine Alternative Produktionsweise des Hydrophobins dar in Form seines Monomers.

A3-2: Fermentation des Hydrophobin-Polyproteins mit Hefe im kleintechnischen Maßstab mit anschließendem Downstream-Processing bis zum gereinigten und aktiven Zielprotein Hfb1

Verfahren 1: Produktion von Hydrophobinen in Form von Poly-Hydrophobinen

Der hh-Stamm wurde in synthetischem Medium bei pH 6.0 mit 10 g/L kultiviert. Nach 25 Stunden wurde die Kultivierung abgebrochen und im Prozedere weiter verfahren wie in Abb. 7 dargestellt (Kultivierungsparameter, Temperatur 30°C, Medium 10 g/L Glucose, pH 6.0). Zunächst erfolgte die Annreicherung der Poly-Hydrophobine. Dazu wurden die Zellen mittels Zentrifugation vom Kulturüberstand getrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden im SDS-PAGE mit anschließender Western Blot Detektion gegen den c-myc Tag durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Expression des Polyhydrophobins (Größe von 19.7 kDa) erfolgreich war und dass eine Sekretion des Proteins in den Überstand erzielt werden konnte.

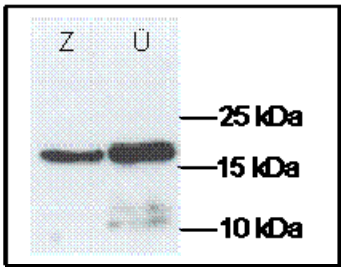


Abbildung 18: Separation der Zellen vom Kulturüberstand durch Zentrifugation. Es wurde das Poly-Hydrophobin (hh-Stamm) nach der erfolgen Kultivierung im Zellysat und im Überstand mittels Western Blot Detektion gegen den c-myc-Tag nachgewiesen, Z = Zellysat (30 µg Protein), Ü = Überstand (1.8 mL nach Säurefällung).

Der Überstand wurde nun weiter verwertet. Mittels Größenausschlusszentrifugation mit einem verwendeten Filter von 10 kDa wurde das Poly-Hydrophobin angereichert. Die Anreicherung wurde auch mittels Western Blot Analyse überprüft und die Ergebnisse sind in Abb. 10 dargestellt. Hier ist zu sehen, dass der verwendete Überstand das Poly-Hydrophobin beinhaltet. Im Durchlauf nach Größenausschlusszentrifigation ist kein Poly-Protein detektierbar. Das Filtrat beinhaltet nun eine hohe Konzentration an Proteinen (F1 hier wurden 25 µL aufgetragen).

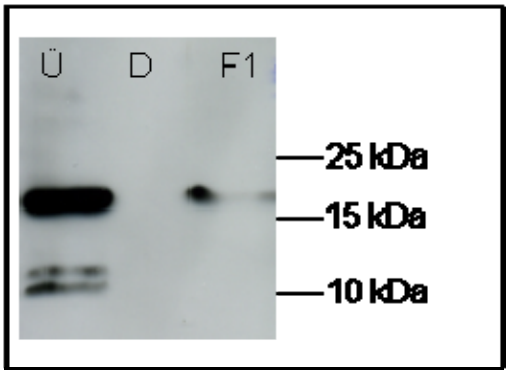


Abbildung 19: Aufkonzentrierung der Polyhydrophobine aus dem Kulturüberstand mittels Größenausschlusszentrifungation. Nachweis über Western Blot Detektion gegen den c-myc-Tag, Ü = Überstand (1.8 mL nach Säurefällung), D = Durchlauf (1.8 mL nach Säurefällung), F1 = Filtrat (25 µL).

Das Filtrat wurde in einem weiteren Schritt mittels Promega TEV Protease prozessiert. Folgende Parameter wurden eingestellt: 0,4 Unit TEV Protease/µg Protein, 30 °C, Schüttelfrequenz von 500 rpm, 0,1 mM DTT im Standard-Reaktionspuffer der Firma Promega, Inkubationszeit von 6 h. Ein Aliquot der Reaktionsansatze im Western Blot analysiert worden und ist in Abb. 11 dargestellt (TEV t=0) Nach Inkubation des Reaktionsansatz wurde über eine weitere Größenausschlusszentrifugation mit einem Filter von 50 kDa durchgeführt. Hierbei ist auffällig, dass auch Proteine die kleiner als 50 kDa sind zurückgehalten wurden (Probe F2). Das Poly-Hydrophobin (19,7 kDa) und das monomere Hydrophobin (10,3 kDa) konnten im Filtrat (F2) nachgewiesen werden. Im Durchlauf konnte weder das Poly-Hydrophobin noch das monomere Hydrophobin detektiert werden. Dies kann vermutlich dadurch erklärt werden, dass durch das Ausbilden von monomeren Hydrophobinen höhermolekulare Strukturen begünstigt werden, da die Hydrophobine unter Umständen an Proteine binden oder sogar mehrere Proteine miteinander verbinden. Im

SDS-PAGE herrschen jedoch reduzierende Bedingungen, welche die höhermolekularen Strukturen wieder zerstören.

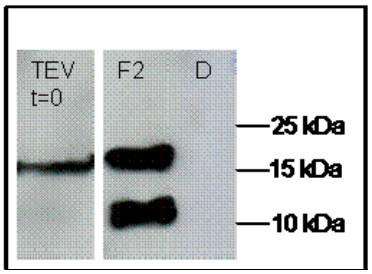


Abbildung 20: Prozessierung der Poly-Hydrophobine unter Verwendung der TEV Protease. Nachweis über Western Blot Detektion gegen den c-myc-Tag nachgewiesen, TEV t0 = Reaktionsansatz zum Zeitpunkt Null Stunden (25 µL), F2 = Reaktionsansatz nach 6 h Inkubation und Größenausschlusszentrifugation mit einem Filter von 50 kDa (25 µL), D = Durchlauf (25 µL).

Die Rückgewinnung der TEV-Protease sollte mittels Größenauschlusszentrifugation mit einem verwendeten Filter von 50 kDa erfolgen. Die TEV Protease konnte in diesem Fall nicht von den monomeren Hydrophobinen abgetrennt werden, da die monomeren Hydrophobine in ihrer aktiven Form höchermolekulare Strukturen ausgebildet haben und somit auch unter Verwendung eines 50 KDa Filters zurückgehalten wurden. Somit entfiel in diesem Fall die angestrebte Aussalzung des monomeren Hydrophobins mit Ammoniumsulfat, da es ja schon auf diesem Weg angereichert werden konnte.

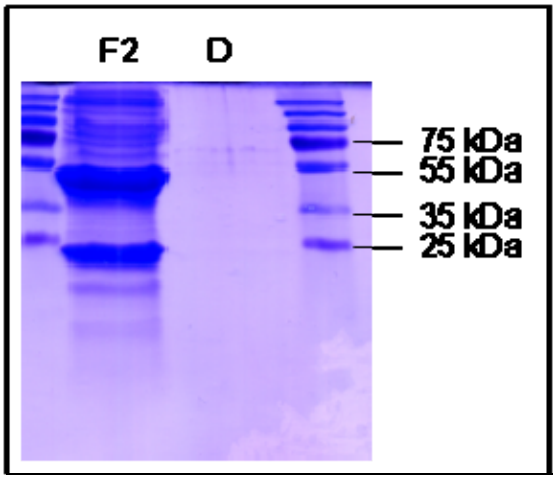


Abbildung 21: Rückgewinnung der TEV Protease aus dem Reaktionsansatz mittels Größenausschlusszentrifugation. Nachweis über Coomassie ,gefärbtes SDS PAGE, F2 = Filtat von 50 kDa (25 µL), D = Durchlauf (25 µL).

In Abb. 12 sind nun das gewonnene Filtrat und der Durchlauf nach Analyse im Coomassi gefärbten Gel dargestellt. Die TEV Protease hat eine Größe von ca. 50 kDa. Eine starke Bande ist im Filtrat sichtbar. Im Durchlauf (D) konnte diese Bande nicht detektiert werden. Somit kann hierzu festgehalten werden, dass sich die TEV Protease im Filtrat anreichen ließ.

Der gesamte Prozess, der in Abb. 7 beschrieben ist, konnte somit komplett durchlaufen werden unter Verwendung des hh-Stammes.

Verfahren 2: Produktion von monomeren Hydrophobinen mit integrierter Reinigung mittels Schaumseparierung während der Kultivierung

Das Hydrophobin Konstrukt wurde unter die Kontrolle eines konstitutiven Promoters gestellt und an seinem Carboxyterminus mit einem c-myc Tag zur immunologischen Detektion versehen. An seinem Aminoterminus ist das Protein mit einem Sekretionssignal versehen. Somit gelangt das Hydrophobin in den Kulturüberstand. Als oberflächenaktives Protein wird sich das Hydrophobin an den Gasblasen-grenzschichten im Bioreaktor akkumulieren und den durch die Begasung entstandenen Schaum stabilisieren. Der Schaum wird dann während der Kultivierung über einen Trichter und den Abgasstrom aus dem Bioreaktor in eine Schaumfalle transportiert. In diesem Schaum soll sich das sekretierte Hydrophobin dann zu hohen Konzentrationen anreichern. Die Hefen wurden in einem gepulsten Fed-Batch Prozess mit Glucose als Kohlenstoffquelle bei einem konstanten pH von 6.0 über 25 h kultiviert. Während der gesamten Kultivierungsdauer wurden Proben aus dem Bioreaktor und der Schaumfalle entnommen und in einem Western Blot analysiert bezüglich der Hydrophobinmenge in den einzelnen Fraktionen. Dazu wurden die Bioreaktorproben durch Zentrifugation in ein Pellet und in den Überstand separiert. Das Zellpellet wurde mechanisch aufgeschlossen und 20 µg Protein wurden analysiert (Abb 9, oberer Teil). Der Überstand aus der Bioreaktorprobe wurde mittels Säurefällung eingeengt und analysiert (Abb. 9, mittlerer Teil). Die Schaumprobe wurde durch Zentrifugation verflüssigt und die Zellen wurden abgetrennt, anschließend wurde auch diese Probe nach Säurefällung im Western Blot analysiert (Abb.9 unterer Teil).

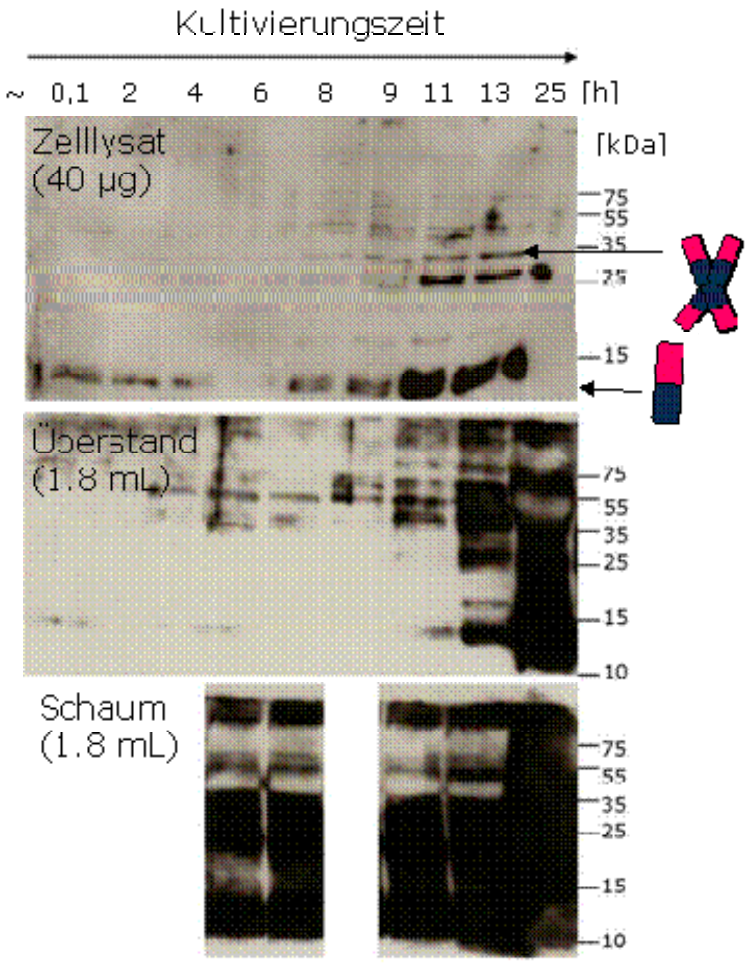


Abbildung 22: Western Blot Analyse der Proben aus dem Bioreaktor und der Schaumfalle gezogen über die Kultivierungsdauer (0,1 H- 25 h). Detektion erfolge mittels c-myc-Antikörper, oberer Teil = Ganzzellysat nach mechanischen Zellaufschluss 40 µg, mittlerer Teil = 1.8 mL Überstand nach Säurefällung mittels TCA, unterer Teil = 1.8 mL Schaumprobe nach Säurefällung mittels TCA. Symbole zeigen monomeres Hydrophobin in der Höhe von ca. 11 kDa, und multimeres Hydrophobin.

Da monomere Hydrophobin besitzt eine molekulare Masse von etwa 11 kDa und kann der unteren auch durch einen Pfeil markierten Bande im oberen Teil der Abb. 9 zugeordnet werden. Höhermolekulare Banden stellen multimere Assemblate des Hydrophobins dar. Aktive Hydrophobine zeigen in Lösung das Bestreben, zu Multimeren zu assemblieren, wie schematisch auch durch den zweiten Pfeil im oberen Teil der Abb. 9 dargestellt.

Im mittleren Teil der Abb. 9 wird deutlich, dass das Hydrophobin in den Überstand sekretiert wird. Des Weiteren konnten große Mengen an Hydrophobin im Schaum detektiert werden (Abb. 9, unterer Teil). Dieses Ergebnis belegt, dass der in Abb. 8 dargelegte Reaktoraufbau mit integrierter **Schaumseparierung sehr geeignet ist, um Hydrophobine schon während der Kultivierung zu akkumulieren**. Um nun den Gehalt und die Reinheit an Hydrophobin im Schaum näher zu bestimmen, wurden weitere Untersuchungen mit dem Schaum gemacht. Von der Schaumprobe wurden verschiedene Volumina im SDS PAGE ihrer Größe nach

separiert, danach wurde das Gel silbergefärbt, um den Gesamtproteingehalt darstellen zu können (Abb. 10, oberer Teil). Ein weiteres Gel wurde geblottet und durch Western Blot Detektion wurde spezifisch das Hydrophobin sichtbar gemacht (Abb. 10, unterer Teil). Auch hier wurden die Hydrophobine in ihren monomeren und multimeren Bausteinen schematisch dargestellt zur besseren Verdeutlichung.

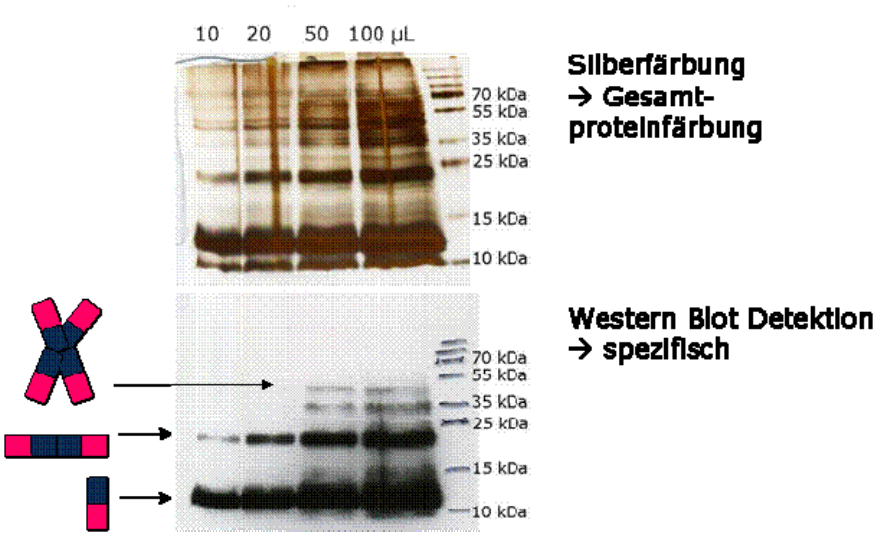


Abbildung 23: Analyse der Schaumprobe am Ende der Kultivierung (25 h). Es wurden verschiedene Volumina von 10 µL, 20 µL, 50 µL und 100 µL analysiert, oberer Teil = Silberfärbung, unterer Teil Western Blot mit Detektion unter Verwendung des c-myc Antikörpers.

In einem letzten Schritt sollte nun nachgewiesen werden, ob das so produzierte Hydrophobin funktional und oberflächenaktiv ist. Dazu wurde eine hydrophobe Plastikoberfläche (Mikrotiterplatte) mit der Hydrophobinlösung in Kontakt gebracht und es wurde untersucht, ob die Oberfläche ihre Benetzungseigenschaften ändert. Wenn die Hydrophobine aktiv sind, sollten sie die hydrophobe Mikrotiterplatte beschichten, ihren hydrophilen Proteinteil nach außen exponieren, und somit die Oberfläche hydrophil und damit benetzbar für Wasser machen. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abb. 11 dargestellt. Als Kontrolle wurde eine BSA Lösung und Wasser als Negativkontrollen mitgeführt.

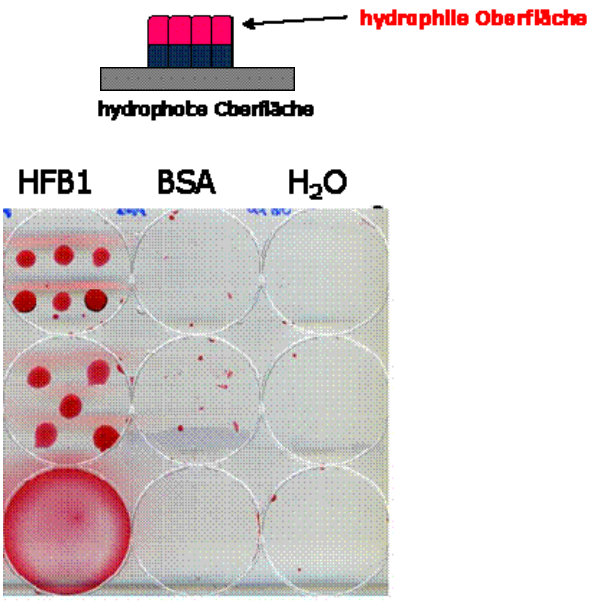


Abbildung 24: Funktionalitätstest der hergestellten Hydrophobine. Eine hydrophobe Mikrotiterplatte wurde mit Hydrophobinen beschichtet. BSA-Lösung und Wasser dienten als Negativkontrollen. Im Anschluss wurde die Benetzbarkeit mit einer rot gefärbten Wasserlösung getestet.

Das Ergebnis aus Abb. 11 zeigt deutlich, dass die Stellen, die zuvor mit der Hydrophobinlösung in Kontakt waren, ihren Benetzungscharakter verändert haben. Im oberen linken Well wurde die Hydrophobinlösung beispielsweise in sechs Spots aufgebracht. Das gefärbte Wasser bleibt genau an diesen sechs Stellen haften. Das rekombinant hergestellte Hydrophobin ist also funktional. **Damit konnte der Nachweis bebracht werden, dass die Prozessweise aus Ansatz 1 eine sehr geeignete Methode ist zur Herstellung von Hydrophobinen.**

Zusätzliche Untersuchungen bezüglich der Aktivität der Poly-Hydrophobine

Untersuchung der Polyhydrophobine auf ihre oberfälchenaktive Wirkung im Vergleich zum monomeren Hydrophobin

Messung des Oberflächendruckes

Um die Fähigkeit der Poly-Proteine, an Grenzschichten zu assemblieren zu untersuchen, wurde eine Filmwaage (Langmiur Blodgett) eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen mit Puffer gefüllten Trog, in den ein Wilhelmy-Plättchen reinragt. Rechts und links befinden sich Barrieren, die auf der Oberfläche der Flüssigkeitsfilms zusammengeschoben werden können, auf das in der Mitte der Versuchsanordnung befindliche Wilhelmy-Plättchen zu. Wenn nun ein oberflächenaktives Protein in den Trog pipettiert wird, lagern sich die Proteine

an der Grenzfläche von Puffer zu Luft an und bilden dort einen Proteinfilm aus. Beim Zusammenschieben dieses Films mittels der Barrieren kommt es zu einer Verdichtung der Proteine, der Oberflächendruck [SP mN/m] steigt, der am Wilhelmy-Plättchen gemessen werden kann. Handelt es sich um ein nicht oberflächenaktives Protein kommt es zu keinem nennenswerten Anstiegt des Oberflächendrucks beim Zusammenfahren der Barrieren.

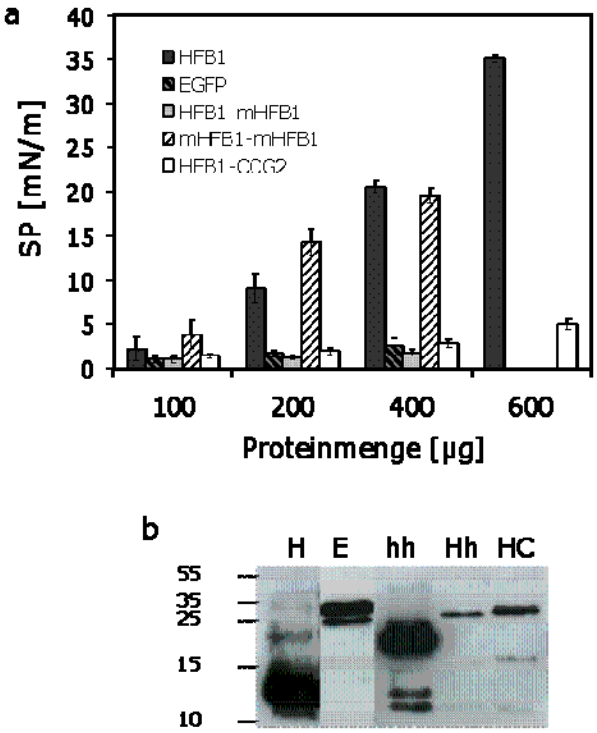


Abbildung 25: (a) Darstellung des maximalen Oberfächendrucks [SP mN/m], der im Langmuir Blodgett System erzielt werden konnte bei vollständigen Zusammenschieben der Barrieren. Positivkontrolle für ein oberflächenaktives Protein ist das monomere HFB1 (H), als Negativkontrolle dient das EGFP (E). Zudem wurden die drei verschiedenen Poly-Hydrophobine vermessen (HFB1-mHFB1 = Hh, mHFB1-mHFB1 = hh und HFB1-CCG2 = HC). Es wurden verschiedene Proteinkonzentrationen getestet von 100 µg - 600 µg Protein in einem Trag mit 230 mL Volumen, 1 mM Acetatpuffer, pH 5.5., 18°C. (b) SDS PAGE mit Western Blot und Detektion gegen c-myc Epitop der eingesetzten Proteine.

Es wurden nun unterschiedliche Konzentrationen der Proteine vermessen. Dabei wurde als Referenz für ein oberflächenaktives Protein das monomere HFB1 verwendet und als Negativkontrolle das nicht oberflächenaktive EGFP.

Das monomere Hydrophobin HFB1 steigt mit zunehmender Proteinkonzentration im maximalen Oberflächendruck auf einen Wert von 35 mN/m bei 600 µg eingesetztem Protein an. Das nichtoberflächenaktive EGFP steigt im maximalen Oberflächendruck nur geringfügig bei steigender Proteinkonzentration an. Der Oberflächendruck steigt nicht über 5 mN/m. Die Poly-Hydrophobine Hh und HC erreichen Werte die vergleichbar mit der Kontrolle (EGFP) für ein nicht oberflächenaktives Protein sind. Das Poly-Hydrophobin hh erreicht Oberflächendrücke, die höher liegen. Dies ist dadurch zu erklären, dass die vermessene

Poly-Hydrophobin Probe bereits in monomere Bausteine zerfallen war, wie aus der Western Blot Analyse ablesbar ist. Somit entspricht das Verhalten des Poly-Hydrophobins in diesem Moment eher dem Verhalten eines monomeren Hydrophobins. Dennoch geben die Ergebnisse, die mit den Poly-Hydrophobinen erzielt werden konnten, einen starken Hinweis, dass das Poly-Hydrophobin im Vergleich zum monomeren Hydrophobin weniger gut in der Lange ist einen Silicium-Wafer zu beschichten. AFM Messungen bestätigen, dass **Poly-Hydrophobine weniger oberflächenaktiv sind als ihre monomeren Bausteine.**

A4-3: Demonstrator: Monitoring der Expression und Prozessierung von Poly-Hydrophobin

Dieser Demonstrator umfasst nun die Zusammensetzung der einzelnen optimierten Teilprozesse aus den einzelnen Arbeitspaketen zu einem kompletten Prozess zur optimalen Herstellung des HFB1. Dabei soll der Expressionsverlauf im Bioreaktor erfasst werden, zu einem optimalen Zeitpunkt soll der Bioprozess dann beendet werden. Nach einem Konzentrierungsschritt zur Anreicherung der Proteine soll eine Prozessierung mit einer Protease angeschlossen werden, um so monomere Hydrophobin-Bausteine zu erhaltern.

A4-3-1: Aufbau eines Reaktors mit extrinsischem Schalten des Aktors (in Zusammenarbeit mit IfG, ILB)

- **Überführung der in den Modulen A1, A2 und A3 erzielten Ergebnisse auf das Demonstrator-System**

Diese Aufgaben wurden durchgeführt, dabei erwies sich der Einsatz des Gelöstsauerstoffsignals als sehr zuverlässiges Signal, um einen optimalen Erntezeitpunkt zu bestimmen. Detailliert ist der gesamte Prozess als Verfahren 1 unter A3-2 dargestellt.

A4-3-2: Untersuchungen zur Kinetik der Teilprozesse "Expression des Fusionsproteins", „Schaltverhalten der Aktorzellen" sowie „Proteolyse des Fusionsproteins" (in Zusammenarbeit mit IfG, ILB)

- **Aktivitätsuntersuchungen in Abhängigkeit vom Konzentration und Fermentationsstatus der das Fusionsprotein erzeugenden Zellen**
- **Aktivitätsuntersuchungen in Abhängigkeit von Konzentrationen des Fusionsproteins und der eingesetzten Proteasen**

Die gesamten Teilprozesse von der Kultivierung im Bioreaktor, die Anreicherung der Poly-Hydrophobine, die Spaltung dieser Poly-Proteine mittels TEV-Protease und die nachfolgende Gewinnung der monomeren Hydrophobine wurde in den Arbeitspaketen A1-A3 untersucht.

Dabei wurde ein optimaler Prozess entwickelt der in Abbildung 7 dargestellt ist. Der optimale Prozess auf Basis von Poly-Hydrophobinen kann somit kurz wie folgt beschrieben werden:
1) Kultivierung im batch Ansatz mit Glucose als Kohlenstoffquelle mit einem konstanten pH von 6.0 bei 30°C. Als optimaler Stamm wurde der hh-Stamm gefunden. Der optimale Erntezeitpunkt konnte, da es sich um eine wachstumsgekoppelte Produktbildung handelt am besten am Gelöstsauerstoffsignal abgelesen werden. Das Fluoreszenzsignal des EGFPs erwies sich dabei als nicht ganz so gut geeignet, da es starkem Abbau unterlag, und da es durch die Sekretion in den Kulturüberstand in stärk verdünnter Form nicht mehr detektierbar war. 2) Anreicherung der Poly-Hydrophobine aus dem Kulturüberstand mittels Größenausschlusszentrifugation. 3) TEV-Prozessierung mit Promega TEV-Protease mit für 6 h bei 30°C, 500 rpm. 4) Die einzelnen Monomere konnten im Anschluss durch Größenausschlusszentrifugation akkumuliert werden.

II 2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der zahlenmäßige Nachweis erfolgt seitens der Verwaltung der TU Dresden in Abstimmung mit dem Projektträger.

II 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die durchgeführten Arbeiten im Rahmen des Projektes erfolgten streng nach den im Antrag fixierten und durch den Projektträger bewilligten Arbeitspaketen. Alle Positionen der Allgemeinen Sachmittel entsprachen in etwa den im Antrag formulierten Angaben.

Nach einem breit angelegten Screening potentiell schaltbarer Hüllstrukturen für die Aktoren wurden im Hinblick auf die anvisierten Demonstratoren Einschränkungen vorgenommen, die daran orientierten, welche Anforderungen hinsichtlich Stabilität, Vitalität und Ansprechverhalten der jeweilige Demonstrator an die Aktor-Hüllstruktur stellte.

Dank der engen Zusammenarbeit zwischen den Projektpartnern konnten zeitnah Ergebnisse ausgetauscht und Rückschlüsse auf die weitere Versuchsplanung gezogen werden, was zur Optimierung der Arbeitsabläufe beitrug.

II 4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die Kontamination von Oberflächen- und Abwässern mit Pharmazeutika gelangt zunehmend ins Interesse auch der öffentlichen Diskussion. Mit den vom IfG hergestellten rekombinanten Hefen konnte erfolgreich das Konzept des Sensor-Aktor-Prinzips verwirklicht werden. Durch die Expression einer Chitosanase in Anwesenheit von Diclofenac gelang es, Aktorhüllstrukturen auf Basis von Chitosan abzubauen.

Die innerhalb des Projektes gewonnenen Erkenntnisse zur Erzeugung von mikrostrukturierten Mehrfachschichten auf der Basis von hexagonal arrangierten „Opferhefen“ liefern einen wertvollen Beitrag beim Aufbau biologischer Sensor-Aktor-Systeme auf der Basis kommunizierender stoffwechselaktiver Mikroorganismen. Es wurde mit Hilfe der Mikrokavitätengenerierung über einen Sol-Gel-Prozess eine Möglichkeit aufgezeigt, stoffwechselaktive Sensor-Aktor-Zellen mit definierten Abständen zueinander auf der Substratoberfläche zu platzieren. Die Laminierung mit Alginat und dessen anschließende Härtung mit $CaCl_2$ stellt eine Option dar, um einerseits die Zellen sicher auf der Oberfläche zu immobilisieren und andererseits die Diffusion von Sensormolekülen oder Nährstoffen zu gewährleisten. Als Herausforderung für weiterführende Untersuchungen werden die Optimierung von Alginatkonzentration und Schichtdicke, damit zusammenhängend die Überlebensfähigkeit der immobilisierten Zellen und vor allem die definierte Platzierung verschiedener, miteinander kommunizierender Sensor-Aktor-Zellen angesehen.

Das Verbundvorhaben war inhaltlich darauf ausgerichtet, wichtige Grundbausteine einer neu zu schaffenden Biosensor-Technologieplattform in der Region zu entwickeln und deren prinzipielle Eignung an vier verschiedenen praxisnahen Anwendungen zu demonstrieren. Die im Projekt gesammelten Erfahrungen und Erkenntnisse fließen direkt in die Planung und Konzeption des angestrebten regionalen Wachstumskerns ein. Ein großer Teil der gefundenen Lösungsansätze und Ergebnisse ist darüber hinaus sehr gut geeignet, um im Rahmen bereits bestehender und neu zu etablierender Lehrveranstaltungen übernommen zu werden.

II 5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Ausgenommen der Herstellung von Hydrophobinen sind keine signifikanten Fortschritte auf dem spezifischen Gebiet des Projektes bei anderen Stellen bekannt geworden.

Die biotechnologische Herstellung von Hydrophobinen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen während der Projektlaufzeit publiziert. Die unten stehende Tabelle gibt einen Überblick über die erfolgten Publikationen.

Klasse	Protein	Organisms	Menge	Protein-charakterisierung	Literatur
II	FcHyd5p	*Fusarium culmorium*	no i/ no i	gushing , revese parafilm	Stübner *et al.* 2010, Lutterschmid *et al.* 2010
I	FcHyd3p	*Fusarium culmorium*	no i/ no i	foam experiments	Lutterschmid *et al.* 2011
I	HGF1	*Grifola frondosa*	86 mg/L	contact angle measurement	Wang *et al.* 2010
I	RodA RodB	*Aspergillus fumigatus*	329 mg/L 262 mg/L	contact angle measurement	Pedersen *et al.* 2011
II	HFBII	*Trichoderma reesei*	no i/ no i	foam experiments	Lutterschmid *et al.* 2011

no i = keine Information

II 6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Erfolgte Veröffentlichungen

Der Kurzbericht wird in elektronischer Form der TIB Hannover zur Veröffentlichung im Internet zur Verfügung gestellt. Teile der Ergebnisse direkter sowie an das Projekt angegliederter Arbeiten wurden und werden auf internationalen Tagungen als Poster präsentiert sowie als Publikation oder Patentschrift publiziert.

Poster:

Pannier A, Koitzsch M, Soltmann U, Soltmann B. (2010) Immobilisierung von Hefezellen in Alginat-Micro-Arrays und – Schichten mit Hilfe von amino-funktionalisiertem SiO_2-Nanosol. 7. Max-Bergmann-Symposium. Dresden.

Matys S, Lakatos M, Katzschner B, Caspari' A, Pompe, W. (2011) Bio-sensing of arsenic by S-layer-modified gold nanoparticles.
1. Workshop Verhalten von Arsen in geologischen, hydrologischen und biologischen Systemen, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung, 12.-13. September 2011, Leipzig,
2. Trends in Nanotechnology (TNT) Conference, 21.-25.11.2011, Teneriffa

Publikationen:

Kottmeier K, Günther TJ, Weber J, Kurtz S, Ostermann K, Rödel G, Bley T. (2011) Constitutive expression of hydrophobin HFB1 from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its pre-purification by foam separation during cultivation. Eng. Life Sci. DOI: 10.1002/elsc.201100155

Kottmeier K, Ostermann K, Bley T, Rödel G. (2011) Hydrophobin signal sequence mediates efficient secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 91:133-141.

Kottmeier K, Ostermann K, Bley T, Rödel G. (2010) Herstellung von Hydrophobinen in *Pichia pastoris*. Chemie Ingenieur Technik 82:1545-1545.

Schuller A, Auffermann G, Zoschke K, Schmidt U, Ostermann K, Rödel G. (2012) Over-expression of CTR1D300, a high-affinity copper transporter with deletion of the cytosolic C-terminus in *Saccharomyces cerevisiae* under excess copper leads to disruption of transition metal homeostasis and transcriptional remodelling of cellular processes. (submitted)

Patententschriften

Kottmeier K, Ostermann K, Rödel G. 2009. Hefe Sekretionssystem auf der Basis einer Signalsequenz aus der Hydrophobin 1-Gensequenz von *Trichoderma reesei*. Patent-Nr.: DE102009055015

Ostermann K, Weber J, Kottmeier K, Deponte S, Bley T, Rödel G. 2010. Hydrophobine in Zellkultivierungen zur Verminderung der Scherbelastungen.
Patent-Nr.: DE102010063942

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht

3. Titel

Biologische Ganzzell-Sensor-Aktor-Systeme für die Bioverfahrenstechnik und Umwelttechnologie (Bio-SAT)

4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Ostermann, Kai; Schuller, Astrid; Wenzel, Mandy; Lauffer, Susann; Matys, Sabine, Soltmann, Bettina; Applhans, Dietmar; Kottmeier, Kirsten; Bley, Thomas; Pompe, Wolfgang; Rödel, Gerhard	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.01.2012
	6. Veröffentlichungsdatum 31.07.2012
	7. Form der Publikation Schlussbericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Technische Universität Dresden, Mommsenstr. 13, 01062 Dresden Institut für Genetik (IfG) Institut für Werkstoffwissenschaft (IfWW) Professur für Organische Chemie der Polymere (OCP) Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik (ILB)	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen 03WKP08
	11. Seitenzahl 119
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 8
	14. Tabellen 19
	15. Abbildungen 105

16. Zusätzliche Angaben

17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)
PTJ, Berlin, 31.07.2012

18. Kurzfassung

In dem Bericht sind die Arbeiten und Ergebnisse der folgenden Arbeitspunkte des Projektes dargestellt:
IfG: Die Arbeiten fokussierten auf die Generierung rekombinanter Hefen für die Module „Sensor“, „Aktor“ oder „Schalter“ des Projektes. Es wurden zahlreiche maßgeschneiderte Hefestämme für den modularen Aufbau von Sensor-Aktor-Systemen, wie z.B für den Nachweis von Diclofenac, dem Abbau von Antibiotika etc., erzeugt..

IfWW: Der Schwerpunkt der Arbeiten des IfWW lag auf der Immobilisierung und der Untersuchung von Überlebensfähigkeit und Stoffwechselleistungen der bereit gestellten Hefestämme sowie dem Design von Immobilisierungsmatrices. Es konnten grundlegende Erkenntnisse hinsichtlich des Verhaltens lebender, rekombinanter Hefezellen in organischen oder anorganischen Matrices gewonnen werden. Am Beispiel von selbstaktivierenden Filtern für chemische Schad- und Arzneistoffe sowie selbst regulierender Zelladsorption zur Rückgewinnung von Metallionen gelang es, das hypothetische Funktionsprinzip erfolgreich nachzuweisen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass auf Chitosan und Cellulose basierende Hüllstrukturen durch genetisch modifizierte Hefen enzymatisch spaltbar.sind. Weiterhin ließen sich Hefezellen mit konstitutiv exprimierten negativen Ladungsclustern auf der Oberfläche auf positiv geladenen planaren Oberflächen abscheiden.

OCP: Die Herstellung hydrogelhaltiger Hüllstrukturen wurde erfolgreich bearbeitet. Es wurden u.a. Enzym-haltige und strukturierte Hydrogelstrukturen mittels kurzlebiger Photovernetzung etabliert.

ILB: Die biotechnologische Herstellung eines oberflächenaktiven Hydrophobins, ausgehend von einem Poly-Hydrophobin, wurde untersucht. Die gesamten Teilprozesse wie die Kultivierung im Bioreaktor, die Anreicherung der Poly-Hydrophobine, die Spaltung dieser Poly-Proteine mittels TEV-Protease und die nachfolgende Gewinnung der monomeren Hydrophobine wurden untersucht. Es wurde ein optimierter Herstellungsprozess entwickelt.

19. Schlagwörter
Rekombinante Hefezellen, Immobilisierung, Hydrogelstrukturen, Hydrophobine, Sensor-Aktor-Systeme

20. Verlag	21. Preis